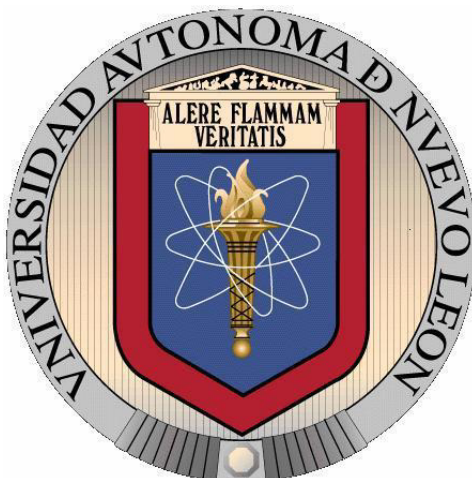


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



TESIS

**“CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR D2 DE DOPAMINA
DURANTE LA ADICCIÓN A LA COMIDA GRASA EN RATONES”**

POR

GUSTAVO VILLARREAL VILLASANA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA
MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

DICIEMBRE 2015

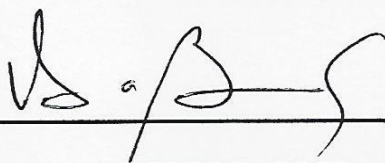
Cambios en la Expresión del Receptor D2 de Dopamina durante la adicción a la comida grasa en ratones.

Aprobación de Tesis:



Dr. C. ALBERTO CAMACHO MORALES

Director de Tesis



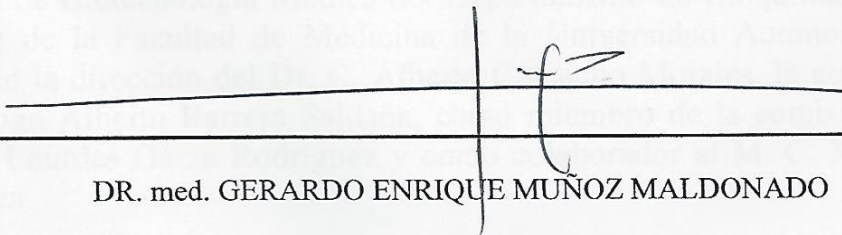
Dr. C. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA

Co-Director de Tesis



Dra. C. MARÍA DE LOURDES GARZA RODRÍGUEZ

Miembro de la Comisión de Tesis



DR. med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO

Subdirector de Estudios de Posgrado

El presente trabajo se realizó en dos sitios diferentes. El primero corresponde al bioterio del Departamento de Farmacología, bajo la organización de la Dra. Lourdes Garza Ocañas, mientras que el segundo sitio corresponde al laboratorio de la Unidad de Biotecnología Médica del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Bajo la dirección del Dr. C. Alberto Camacho Morales, la co-dirección del Dr. C. Hugo Alberto Barrera Saldaña, como miembro de la comisión la Dra. C. María de Lourdes Garza Rodríguez y como colaborador al M. C. Mauricio de la Rosa Garza.

AGRADECIMENTOS

En primer lugar agradecer a Dios por esta oportunidad que me ha brindado en la vida y la cual puedo concluir.

En segundo lugar a mi Comisión de Tesis, así como todas aquellas personas que con buenas intenciones, decidieron apoyarme con su conocimiento y sugerencias al momento de realizar mi trabajo de investigación. En específico a la Dra. C. Lourdes Garza por proporcionar el laboratorio y el equipo necesario para realizar los estudios moleculares de esta tesis.

También agradecer a todos aquellos integrantes del equipo de laboratorio de UBM, en específico a la M. C. Mariel Oyervides y Daniela Ovalle que generosamente también me apoyaron con sus conocimientos y sugerencias.

Agradecer a mi familia por su apoyo incondicional, y por último, agradecer a mis compañeros de generación, simplemente por el hecho de haberlos conocido.

Contenido

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABLAS.....	viii
ABREVIATURAS.....	ix
RESÚMEN.....	11
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1. LA OBESIDAD.....	12
1.1.1 La obesidad en México.....	12
1.1.2. Bases fisiológicas del desarrollo de la obesidad.....	13
1.2. LAS ADICCIONES.....	14
1.2.1. Factores que causan la adicción.....	15
1.3. LA ADICCIÓN A LA COMIDA, UNA DE LAS CAUSAS DEL DESARROLLO DE LA OBESIDAD.....	16
1.4. EL CEREBRO COMO BLANCO DE LAS DROGAS.....	17
1.4.1. Neuroanatomía del circuito de la recompensa	18
1.5. EL SISTEMA DOPAMINÉRGICO Y SU PAPEL EN EL ESTRIADO VENTRAL, COMO MODULADOR DEL IMPULSO DE LA BÚSQUEDA Y EL CONSUMO DE LA RECOMPENSA.....	18
1.5.1. Vías dopaminérgicas.....	18
1.5.2. La tirosina hidroxilasa y la síntesis de dopamina.....	19
1.5.3. Los receptores de la dopamina	20
1.5.4. La dopamina, un neurotransmisor que promueve la motivación para la búsqueda de la recompensa.....	22
1.5.4.1. Vía CSTC motora.....	22
1.5.4.2. Vía CSTC asociativa.....	23
1.5.4.3. Vía CSTC límbica.....	23
1.6. LAS ADICCIONES ALTERAN LA FUNCIÓN DEL SISTEMA DOPAMINÉRGICO EN EL CEREBRO.....	25
1.6.1. Disminución del DRD2 en el NAc impulsa la búsqueda de la recompensa durante la adicción.....	25
CAPÍTULO II. JUSTIFICACIÓN.....	27
CAPITULO III. OBJETIVO GENERAL.....	27
3.1. Objetivos específicos.....	27
CAPÍTULO IV. HIPÓTESIS	27
CAPITULO V. ESTRATEGIA GENERAL	27

CAPITULO VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	28
6.1. Material.....	28
6.1.1. Kit AllPrep ADN / ARN Mini – QIAGEN.....	28
6.1.2. Kit High-Capacity cDNA Archive – Applied Biosystems.....	28
6.1.3. Kit SYBR® Green PCR Master Mix– Applied Biosystems.....	29
6.1.4. Primers	29
6.1.5. Animales.....	29
6.1.6. Dietas empleadas en el estudio.....	30
6.2. Método.....	30
6.2.1. Exposición de los ratones a dieta alta en grasas y dieta control.....	30
6.2.2. Prueba de preferencia de lugar	31
6.2.2.1. 1er día. Pre condicionamiento.....	32
6.2.2.2. Día 2 al 13. Condicionamiento.....	32
6.2.2.3. Día 14. Prueba de Preferencia de lugar.....	32
6.2.3. Disección de tejidos cerebrales.....	33
6.2.4. Extracción de ARN.....	33
6.2.5. Conversión de ARN a cDNA empleando retrotranscripción	34
6.2.6 Reacción de PCR en tiempo real.....	34
6.2.7. Análisis estadístico.....	35
CAPÍTULO VII. RESULTADOS.....	36
7.1. Objetivo específico 1. Determinar el incremento en el peso y consumo de comida de ratones expuestos a dieta grasa.....	36
7.2. Objetivo específico 2. Determinar la adicción y/o preferencia a la ingesta de comida grasa en ratones no obesos.....	37
7.3. Objetivo específico 3. Cuantificar el nivel de expresión del gen del receptor D2 en el NAc de ratones con adicción y/o preferencia a la ingesta de comida grasa.....	41
CAPÍTULO VII. DISCUSIÓN.....	44
CAPITULO VIII. CONCLUSIONES.....	46
CAPÍTULO IX.-BIBLIOGRAFÍA.....	47

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. La obesidad incrementa la susceptibilidad a desarrollar "enfermedades no transmisibles".....	12
Fig. 2. Distribución de la obesidad en el mundo.....	13
Fig. 3. La obesidad en México.....	13
Fig. 4. Similitudes entre la adicción a las drogas y la obesidad.....	17
Fig. 5. Vías dopaminérgicas.....	19
Fig. 6. Sinápsis dopaminérgica.....	22
Fig.7. Circuitos neuronales asociados a la regulación de la recompensa.....	24
Fig.8. Imagen representativa que corresponde a la metodología empleada para realizar el objetivo específico 1.....	30
Fig. 9. Caja conductual de Skinner.....	31
Fig. 10. Protocolo para la prueba de preferencia de lugar.....	33
Fig. 11. Ingesta de comida de ratones expuestos a las dietas.....	36
Fig. 12. Peso corporal de ratones después de su exposición a las dietas.....	36
Fig. 13. Resultados de la prueba de preferencia de lugar I.....	37
Fig. 14. Resultados de la prueba de preferencia de lugar II	38
Fig. 15. Resultados de la prueba de preferencia de lugar III.....	39
Fig. 16. Ingesta de comida de ratones adictos.....	40
Fig. 17. Ingesta de comida de ratones no adictos.....	40
Fig. 18. Ingestas de comida de ratones adictos y no adictos	41
Fig. 19. Curvas de amplificación y curvas de disociación del gen ACTB.....	42
Fig. 20. Curvas de amplificación y curvas de disociación del receptor de dopamina D2.....	42
Fig. 21. Niveles de expresión del gen DRD2 en el NAc Shell de ratones adictos y no adictos.....	43

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características de los cinco receptores de la dopamina.....	21
Tabla 2. Componentes del Kit AllPrep ADN / ARN Mini – QIAGEN.....	28
Tabla 3. Reactivos del Kit High-Capacity cDNA Archive – Applied Biosystems	28
Tabla 4. Características de los primers utilizados.....	29
Tabla 5. Protocolo para la preparación de un volumen de reacción	34
Tabla 6. Condiciones de preparación en el termociclador.....	34

ABREVIATURAS

IMC	Índice de masa corporal
OMS	Organización mundial de la salud
ADH	Alcohol deshidrogenasa
ALDH	Aldehído deshidrogenasa
DRD1	Receptor de dopamina 1
DRD2	Receptor de dopamina 2
DRD3	Receptor de dopamina 3
DRD4	Receptor de dopamina 4
DRD5	Receptor de dopamina 5
DSMIV	Manual de Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales
NAc	Núcleo accumbens
VP	Ventral pallidum
TH	Tirosina Hidroxilasa
CPF	Corteza prefrontal
OFC	Corteza prefrontal cingulada orbital
ACC	Corteza prefrontal cingulada anterior
CPFD	Corteza prefrontal dorsal
VS	Estriado ventral
DS	Estriado dorsal
ATV	Área tegmental ventral
SN	Sustancia negra
MD	Núcleo dorsal medial del tálamo
SNc	Substancia negra pars compacta
vmCPF	Corteza prefrontal ventromedial
dACC	Corteza cingulada dorsal anterior
CeM	Núcleo central medial del tálamo
L-DOPA	L-3,4 dihidroxifenilalanina
RNA	Ácido ribonucleico
AC	Adenilato ciclasa

AMPe	Adenosín monofosfato cíclico
VDA	Vesículas con el neurotransmisor dopamina
DAT	Proteína transportadora de la dopamina
CSTC	Cortico-estriado-tálamo-cortico
MSNs	Neuronas espinosas medianas
GPI	Globus pallidus interno
GPe	Globus pallidus externo
STN	Núcleo subtalámico
ADN	Ácido desoxirribonucleico

RESÚMEN

Nombre: Q.F.B. Gustavo Villarreal Villasana.

Fecha de Graduación: Enero, 2015.

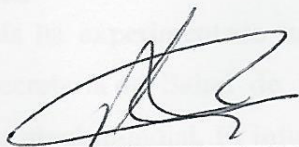
Institución: Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina.

Candidato para el Grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Título del estudio: “CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR D2 DE DOPAMINA DURANTE LA ADICCIÓN A LA COMIDA GRASA EN RATONES”.

Número de páginas: 56.

Introducción. La obesidad es un problema de salud a nivel mundial. El desarrollo de obesidad se asocia al incremento en la ingesta de alimentos hipercalóricos en parte a que la comida puede tener propiedades “adictivas”. El desarrollo de adicción involucra cambios aberrantes en la plasticidad sináptica del cerebro, entre los que destacan alteraciones en el sistema dopaminérgico. Diversos estudios indican que la conducta de adicción a las drogas produce una disminución del contenido del receptor de dopamina 2 (DRD2) en el estriado. Sin embargo, se desconoce si dichos cambios estén presentes durante el desarrollo de adicción a la comida hipercalórica en fases tempranas al desarrollo de obesidad. En este contexto, el objetivo principal de la presente tesis fue determinar si la ingesta de comida hipercalórica presentaba propiedades adictivas empleando la prueba conductual de preferencia de lugar. Adicionalmente, se analizó si la conducta adictiva se asociaba con el decremento del contenido del DRD2 en el estriado empleando PCR en tiempo real. Los resultados indican que los ratones muestran preferencia hacia el consumo de comida alta en grasa en comparación con la comida control. Además, la ingesta de comida alta en grasa ejerció cambio de preferencia de lugar hacia el compartimento menos favorable (lado luminoso de la caja de conducta), corroborando su efecto adictivo. No obstante, esta conducta adictiva no correlaciona con cambios en el nivel de expresión del DRD2 en el estriado. Nuestros resultados indican que la comida hipercalórica es un poderoso inductor de conducta adictiva y no está asociada con cambios en la expresión del DRD2 en el estriado.



Dr. C. ALBERTO CAMACHO MORALES
Director de Tesis

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1. LA OBESIDAD

La obesidad se define como una acumulación anormal o excesiva de grasa corporal a juzgar por el índice de masa corporal (IMC) que presenta un individuo, el cual se calcula dividiendo el peso de una persona en kilogramos por el cuadrado de su talla en metros (kg/m^2). Un IMC igual o superior a 25 determina sobrepeso y un IMC igual o superior a 30 se clasifica como obesidad.

La obesidad representa un grave problema de salud a nivel mundial, ya que su presencia incrementa el riesgo de presentar algún tipo de enfermedad, entre las que podemos nombrar la diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares e incluso algunos tipos de cánceres. En general, el sobrepeso y la obesidad incrementa la susceptibilidad a padecer algún padecimiento de las nombradas "enfermedades no transmisibles" (Fig. 1)¹, repercutiendo en la productividad económica de los países que la padecen (Fig. 2).¹⁻⁴

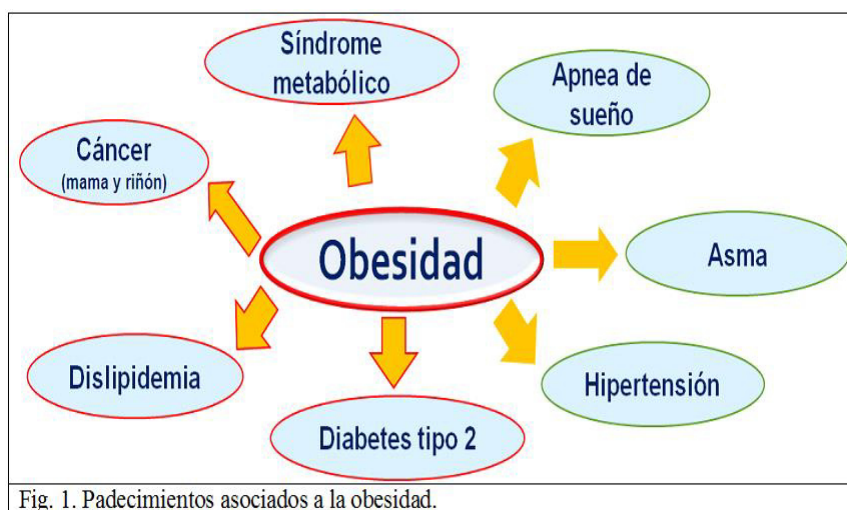


Fig. 1. Padecimientos asociados a la obesidad.

1.1.1 La obesidad en México

La obesidad en nuestro país ha experimentado un alarmante crecimiento en los últimos años.⁵ El informe de la Secretaría de Salud de México (2013) coloca a México en el segundo lugar en obesidad a nivel mundial. El informe representa el 71.3% (48.6 millones de personas) de la población adulta (mayores e igual a 20 años de edad) con sobrepeso u obesidad, mientras que en la población escolar (5-11 años) la prevalencia de sobrepeso es de 19.8 y la de obesidad es de 14.6% (Fig. 3)^{6,7}. Yucatán ocupa a nivel nacional el primer

lugar con mayor cantidad de obesos y con sobrepeso en su población adulta, le sigue Baja California Sur y Campeche, Tabasco y Baja California Norte.^{7,8}

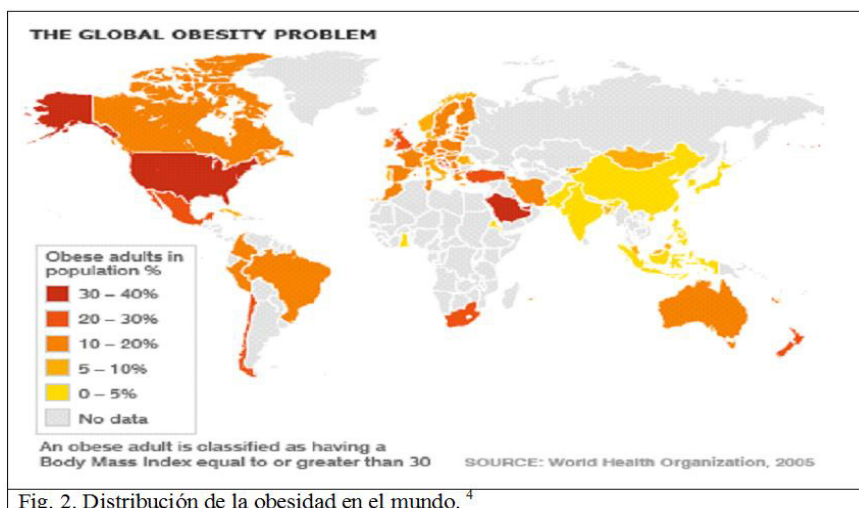


Fig. 2. Distribución de la obesidad en el mundo.⁴



Fig. 3. La figura muestra los cinco estados con mayor porcentaje de obesidad en México de acuerdo a los datos de la Secretaría de Salud Pública en México en el 2012.⁷

1.1.2. Bases fisiológicas del desarrollo de la obesidad

La obesidad es causada por un desequilibrio metabólico entre las calorías que un individuo ingiere y las que gasta. Se ha propuesto que algunos de los factores que propician este desequilibrio energético involucran al estilo de vida moderna, influenciado por la publicidad de los alimentos hipercalóricos, el precio accesible para poder adquirirlos, relacionado al florecimiento económico de los países con economías emergentes, y en algunos casos, acentuado todo lo anterior por mezclas de alimentos altamente apetecibles que resultan agradables al paladar.¹⁻⁴ Respecto a este último

concepto, se ha propuesto recientemente que la comida puede tener "propiedades adictivas" promoviendo su ingesta descontrolada hasta generar un comportamiento compulsivo a su consumo.⁹ En esta tesis se abordará esta teoría, con especial énfasis en las "propiedades adictivas y de selección de la comida" desde el punto de vista conductual y molecular a nivel cerebral, como una posible causa de la obesidad. Sin embargo, para entender las bases neurobiológicas de la adicción a la comida, definiremos a continuación la adicción como un mecanismo neuropatológico de plasticidad neuronal.

1.2. LAS ADICCIONES

Las adicciones pueden definirse como la búsqueda compulsiva al consumo de alguna o varias drogas a pesar de las consecuencias negativas que esta conducta acarrea.¹⁰ Aunque pueden existir diferentes nociones sobre la naturaleza misma de la adicción, dependiendo del contexto en el que se desarrolla el individuo, el concepto de adicción, al menos por parte del área médica, está relacionado con cambios patológicos neuroadaptativos.¹⁰⁻¹² El Manual de Diagnóstico y Estadística de Enfermedades Mentales, 4th. Ed. (DSMIV-TR), define la dependencia a sustancias (que es sinónimo de adicción) como un patrón mal adaptativo al consumo de sustancias (drogas), que conlleva al deterioro o malestar clínicamente significativo, expresado por tres (o más) de las siguientes características, que se producen en cualquier momento dentro de un período de 12 meses:

- (1) Tolerancia.
- (2) Abstinencia.
- (3) Uso excesivo de la sustancia.
- (4) Pérdida de control hacia el consumo.
- (5) Gran inversión de tiempo dedicado a la obtención de la sustancia.
- (6) Aislamiento.
- (7) Consumo de la droga a pesar de saber de las consecuencias negativas que acarrea.

Este tipo de clasificación es aplicable tanto para las drogas ilegales y como las legales, sin embargo, también se reconoce que las formas de comportamiento pueden bien considerarse un tipo de adicción, incluyendo: los juegos de azar, el sexo, el

trabajo, la comida, las compras y la navegación o juegos por internet.¹¹ Aunque en este contexto, aún no está claro si todos estos comportamientos lo sean. De hecho, actualmente el Manual de Diagnóstico y Estadística de Trastornos Mentales (The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders o DSM) no reconoce el término "adicción a la comida" como un proceso que comparta y presente tres o más de las siete características antes descritas, por lo tanto no es extraño ver publicaciones donde se resalte este comentario y que además se dude de dicho concepto.^{11, 12} Entre los puntos débiles que se usan para negar que la comida es adictiva, se menciona el desconocimiento de las señales moleculares que determinarían su adicción, comparadas con las drogas y otros estímulos adictivos.^{12, 13-16} Estas diferencias y algunas similitudes serán mencionadas en la siguiente sección.

1.2.1. Factores que causan la adicción

Los factores que causan la adicción son divididos en dos tipos: genéticos y ambientales o emocionales.^{12, 17, 18} Numerosos estudios en familias y con gemelos han identificado el papel de la herencia sobre el desarrollo de adicción. Por ejemplo, estudios en gemelos sugieren que del 33 -71% de la dependencia al consumo de nicotina se puede atribuir a influencias hereditarias, mientras que el 48 -66% de la dependencia al alcohol es heredable. Por su parte, se estima que la influencia genética para el consumo de cocaína varía desde un 42% hasta un 79%.¹² Para algunas adicciones, se conocen bien los biomarcadores moleculares que determinan su susceptibilidad, por ejemplo, se sabe que variantes de las enzimas alcohol deshidrogenasa (ADH) y la aldehído deshidrogenasa (ALDH), se relacionan con la tolerancia o intolerancia al alcohol.^{12, 17} Igualmente, se han reportado variantes polimórficas en los sistemas de neurotransmisión dopaminérgico, glutamatérgico, GABAérgico, serotoninérgico, opiode y canabinoide, entre otros.^{12, 17, 19} Respecto al sistema dopaminérgico, algunos estudios en el receptor de dopamina tipo 2 (DRD4), relacionan el polimorfismo de repeticiones en tándem de número variable (VNTR) en el tercer exón del gen para este receptor con el desarrollo de la adicción a los opiáceos.¹⁷ Adicionalmente se ha identificado un polimorfismo en el

DRD2, el alelo DRD2 TaqI A1 (o DRD2 A1), que se asocia con un decremento en su expresión, con el desarrollo de afecciones neuropsiquiátricas (esquizofrenia, migraña, o el estrés postraumático) y con sujetos con tendencias a la adicción a varios tipos de drogas.^{18,}

²⁰ Los detalles moleculares de todos estos cambios en el sistema nervioso central se describirán más adelante.

Por otra parte, la exposición a factores ambientales o emocionales durante la infancia, modula positivamente la susceptibilidad a desarrollar adicción en la adolescencia. Lo anterior se confirma por experimentos conductuales en humanos, dónde la exposición a ambientes afectivos negativos promueve incremento de la reactividad y recaída en personas durante el periodo de abstinencia al alcohol.²¹ Asimismo, empleando modelos animales se ha demostrado que la exposición a un ambiente negativo, asociado a la falta de cuidados maternos o el aislamiento neonatal del animal, produce una mayor dependencia a la cocaína y una mayor liberación de dopamina si se compara con animales control. Inclusive, otras investigaciones mencionan que las experiencias negativas pueden ocasionar cambios epigenéticos en el cerebro de los animales, los cuales podrían modular la función neuronal que se observa en el cerebro de humanos en condiciones de estrés, incrementando la susceptibilidad para desarrollar adicciones a través de la epigenética.^{19, 22-35}

1.3. LA ADICCIÓN A LA COMIDA, UNA DE LAS CAUSAS DEL DESARROLLO DE LA OBESIDAD

La clasificación de la adicción a la comida como concepto similar a la de las drogas, es contradictoria y a la vez confusa, sin embargo, ambas condiciones comparten muchas similitudes en cuanto a sus mecanismos de acción y reacción (Fig. 4): 1). La comida produce síntomas de abstinencia parecidos a los generados por las drogas, 2) de acuerdo al manual de DSMIV, los sujetos que sufren de un desorden alimenticio presentan incapacidad para disminuir la ingesta o los atracones de comida, a pesar de las consecuencias negativas que trae consigo,³⁶⁻³⁹ 3) la ingestión de comida y drogas promueven la liberación de dopamina,^{36,37} 4) la comida y las drogas decrecen los niveles del DRD2 en el cerebro de humanos,^{40,41} y en animales expuestos

a comida hipercalórica,⁴² 5) la disminución del DRD2 o de la expresión del alelo Taq A1 D2 se reproduce en sujetos con obesidad o sobrepeso^{16,43} y puede afectar otras conductas adictivas, como las apuestas,⁴⁴ y 6) la ingesta de drogas y comida estimulan las mismas regiones del sistema de recompensa del cerebro (véase detalles a continuación). A pesar de la evidencia científica que apoya la hipótesis de un mecanismo adictivo a la ingesta de comida grasa, aún existen preguntas sin resolver que requieren ser esclarecidas.⁴⁵



1.4. EL CEREBRO COMO BLANCO DE LAS DROGAS

El consumo de drogas afecta la fisiología normal del cerebro y también puede promover efectos secundarios dependiendo del tipo de droga que se consuma.⁴⁶ En general, se ha demostrado que las drogas alteran la neuroplasticidad del cerebro en diversas regiones del circuito de la recompensa, promoviendo alteraciones en la liberación de neurotransmisores e influyendo en las conexiones entre las neuronas que están destinadas a la percepción de estímulos externos.^{10, 25} Por ello, se dice que el consumo de drogas "secuestra" la función del cerebro y lo inhabilita para responder adecuadamente al medio externo.⁴⁷

1.4.1. Neuroanatomía del circuito de la recompensa

Las regiones neuroanatómicas involucradas en la regulación de la ingesta de drogas asociadas a la recompensa, fueron identificadas por Olds y Milner (1954), empleando ratas implantadas con electrodos en diversas regiones cerebrales.⁴⁸ Hoy en día sabemos que estas

regiones forman parte del circuito mesocorticolímbico, también llamado vía de la recompensa, la cual se preserva en los humanos (Fig. 5).⁴⁹

El circuito mesocorticolímbico se integra anatómica y funcionalmente a través de inervaciones sinápticas que se modulan y activan por la intervención de varios sistemas de neurotransmisión, entre los que destacan, el sistema glutamatérgico, el GABAérgico, el serotoninérgico y el dopaminérgico. A excepción del sistema dopaminérgico que se describe a continuación, los tres sistemas restantes se integran por la participación de regiones externas al circuito mesocorticolímbico, que por el momento no se consideran de relevancia para el fin de esta tesis.^{49, 50}

1.5. EL SISTEMA DOPAMINÉRGICO Y SU PAPEL EN EL ESTRIADO VENTRAL, COMO MODULADOR DEL IMPULSO DE LA BÚSQUEDA Y EL CONSUMO DE LA RECOMPENSA

El sistema dopaminérgico es un sistema de neurotransmisión que coordina procesos neurofisiológicos que incluyen la motricidad, la cognición, la motivación, el sueño y la memoria.⁵⁰

1.5.1. Vías dopaminérgicas

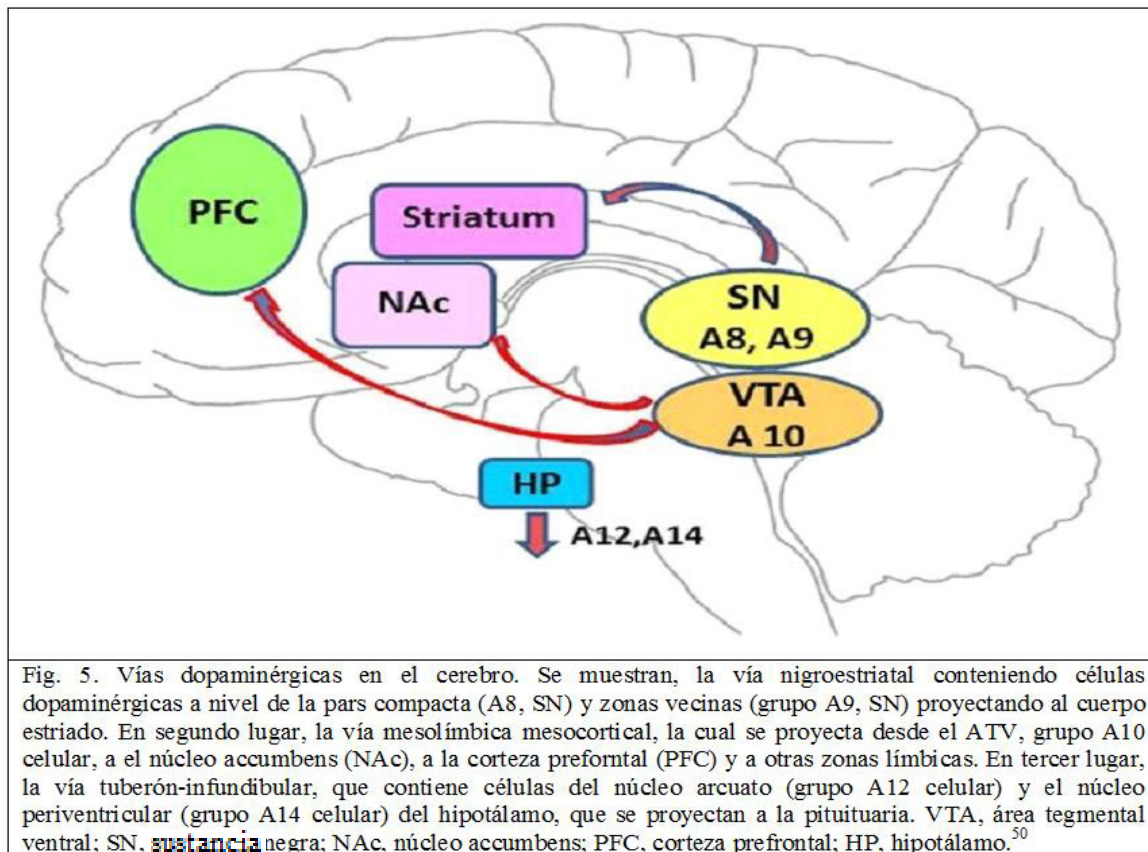
Las neuronas que producen el neurotransmisor dopamina componen cuatro vías dopaminérgicas en el cerebro, que incluyen:

- * Vía mesolímbica. Representada por las neuronas del área tegmental ventral (ATV) que se proyectan preferencialmente al estriado ventral (VS), en específico al núcleo accumbens (NAc), e incluye otras proyecciones antes mencionadas como lo es a la amígdala, al hipocampo y otras regiones límbicas.⁵³ Se le relaciona más específicamente con la recompensa, el placer y con la motivación. Esta vía es muy importante para el presente proyecto.

- * Vía mesocortical. Se transmite desde el ATV al lóbulo frontal, en específico, a la corteza prefrontal. Se le involucra en las respuestas ejecutivas y también emocionales.

* Vía nigroestriatal. Nace desde las neuronas dopaminérgicas que yacen en la sustancia negra (SN) y se proyectan al estriado, en específico al estriado dorsal (DS), lo que es al núcleo caudado y putámen. Implicada en el control motor.

* Vía tuberoinfundibular. Esta vía se transmite desde las neuronas que se derivan del núcleo arqueado (grupo celular A12) y el núcleo periventricular (grupo celular A14) del hipotálamo que se proyectan a la pituitaria. Su papel consiste en regular la secreción de prolactina desde la glándula pituitaria anterior. Cabe señalar que existe comunicación entre la vía mesolímbica y la vía mesocortical (Fig.5).⁵⁰⁻⁵³



1.5.2. La tirosina hidroxilasa y la síntesis de dopamina

El neurotransmisor de vía dopaminérgica es el neurotransmisor dopamina, que se sintetiza por la enzima tirosina hidroxilasa (TH), la que constituye la enzima limitante de su síntesis. La TH utiliza el aminoácido L-tirosina para producir L-DOPA, un sustrato que sirve no

sólo para la producción de dopamina, sino también para la producción de otras dos catecolaminas.^{53, 54}

1.5.3. Los receptores de la dopamina

Posterior a su síntesis, la dopamina se almacena en las vesículas presinápticas y se libera sinápticamente a través de exocitosis inducida por el incremento en el influjo de calcio asociado a la despolarización de la membrana. Una vez en el espacio sináptico, la dopamina puede unirse a sus receptores de tipo D1 o tipo D2 en la membrana post-sináptica o a su receptor tipo D2 presente en la membrana de la neurona presináptica. Dentro de los dos tipos de receptores se encuentran cinco subtipos con características distintivas y algunas compartidas (Tabla 1).⁵⁵⁻⁵⁷ De manera importante, los receptores del tipo D1 (DRD1 y DRD5) están acoplados a la familia Gas/olf de las proteínas G para estimular la producción de AMPc por medio de la activación de la adenilato ciclasa (AC), mientras que los receptores de tipo D2 de dopamina (DRD2, DRD3 y DRD4) están acoplados a la familia Gai/o de las proteínas G y por lo tanto inducen la inhibición de la AC y con ello inhiben la producción de AMPc.^{52, 58-60} Además se conoce que el DRD2 es un autoreceptor, y se le considera como un modulador pre-sináptico que induce retroalimentación negativa, inhibiendo la síntesis de dopamina en la presinapsis y su liberación. La importancia de la activación del D1 radica en que puede llevar a la fosforilación y activación de factores de transcripción, incluyendo CREB y AP-1, y regular la transcripción de genes. Con ello, se piensa que los receptores de tipo D1 activan rutas de señalización contrarias a las de los receptores de tipo D2. Ante este suceso, cambios en el cociente D1/D2 influyen en la estimulación neuronal y en la respuesta conductual a los estímulos externos.⁵⁴⁻⁵⁷

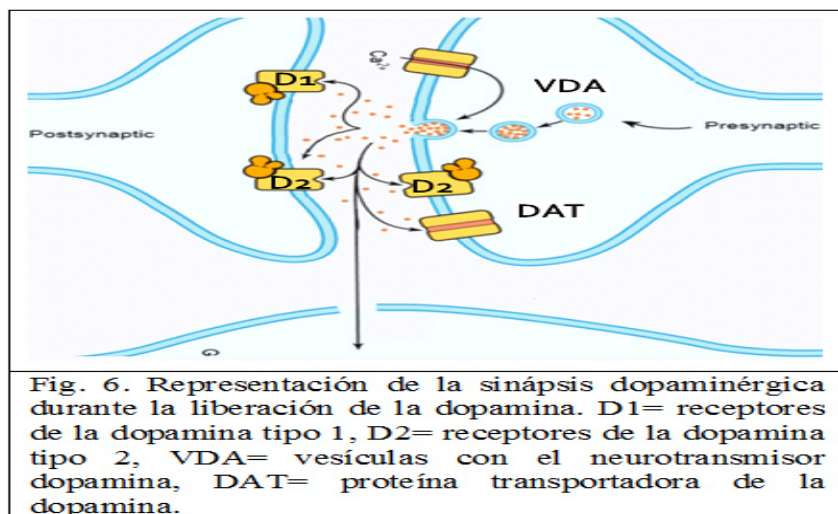
Tabla 1. Características de los cinco receptores de la dopamina.⁵⁵

Tipo de receptor de dopamina:	D1	D2	D3	D4	D5
Símbolo del gen:	DRD1	DRD2	DRD3	DRD4	DRD5
Locus:	5q35.1	11q23.1	3q13.3	11p15.5	4p16.1
# de intrones:	Ninguno	6	5	3	Ninguno
Pseudogenes:	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	DRD5P1, DRD5P2
Variantes de corte y empalme:	Ninguna	Sí, D2S, D2L	Sí	Sí	Ninguna
# de aminoácidos:	446	D2S, 414; D2L, 443	400	387	477
PM:	49,300	D2S, 47,347; D2L, 50,619	44,225	41,487	52,951
Proteínas G acopladas:	Gas, Gαolf	Gai, Gαo	Gai, Gαo	Gαi, Gαo	Gas, Gαq

Respecto a su expresión en el cerebro, los DRD1 se expresan a un alto nivel de densidad en las áreas nigroestriatales, mesolímbicas y mesocorticales, mientras que los DRD5 se expresan en niveles bajos en múltiples regiones del cerebro, lo que incluye a las neuronas piramidales de la corteza prefrontal, de la corteza premotora, de la SN, el hipotálamo y el hipocampo, entre otras partes. En el caso de los receptores de tipo D2, los niveles más altos del DRD2 se encuentran en el cuerpo estriado, en el NAc y el tubérculo olfatorio. Los receptores DRD2 también se expresan en niveles significativos en la SN, en el ATV, en el hipotálamo, y en áreas corticales, el septum, la amígdala e hipocampo. El DRD3 tiene un patrón más limitado de distribución, observándosele el nivel más alto de expresión en las áreas límbicas, mientras que el DRD4 tiene el nivel más bajo de expresión en el cerebro. Por lo tanto, los DRD1 y el DRD2 son los dos receptores de dopamina más ampliamente expresados en el cerebro.⁵⁵

Finalmente, después de la activación de los receptores, la dopamina se recaptura por el sistema de transportadores de dopamina (DAT) localizado en las regiones presinápticas o

en las células gliales y se almacena para su posterior uso (reciclaje) o degradación, completando el ciclo (Fig. 6).⁵⁵



1.5.4. La dopamina, un neurotransmisor que promueve la motivación para la búsqueda de la recompensa

La liberación de dopamina promueve la motivación para la búsqueda de la recompensa y el movimiento motor para obtenerla.⁶¹ Existen por lo menos tres vías que se retroalimentan encargadas de modular la motivación y el movimiento para obtener la recompensa: la cortico-estriado-tálamo-cortical (CSTC) motora, la CSTC asociativa y la CSTC límbica. A continuación se describen a detalle:

1.5.4.1. Vía CSTC motora

Esta vía integra diversas estructuras, entre ellas destacan la corteza motora y somatosensorial, el estriado dorsal (DS), el globo pálido interno (GPi) y externo (GPe), el núcleo subtalámico (STN) y el tálamo, así como la sustancia negra. Aquí, la corteza motora y la corteza somatosensorial parietal proyectan al estriado. En el estriado, el tipo neuronal predominante son las neuronas espinosas medianas (MSNs), siendo aproximadamente el 90% del total de neuronas estriatales. Las neuronas estriatales usan el neurotransmisor GABA y pueden clasificarse en dos tipos: las de tipo D1 (productoras de la sustancia P), y las D2 (producen encefalina). Las neuronas D1 positivas forman la vía directa, mientras que las neuronas D2 positivas integran la llamada vía indirecta. De manera general se sabe

que la vía directa activa el movimiento por medio de la inhibición del GPi, mientras que la vía indirecta inhibe el movimiento por medio de la excitación del GPi. El papel que ejerce la dopamina en el control del movimiento radica en que su liberación inhibe la vía indirecta, que contiene predominantemente a los receptores D2, y por lo tanto promueve el movimiento hacia la búsqueda de la recompensa.^{58, 59}

1.5.4.2. Vía CSTC asociativa

El circuito asociativo comienza en la corteza orbitofrontal lateral y dorsolateral y se conecta con el cuerpo estriado, cerca de la cabeza del núcleo caudado y la porción anteromedial del putámen. A continuación, pasa a través del GPi y la sustancia negra, antes de entrar en el tálamo a través del pedúnculo talámico inferior y llegar a los núcleos dorsomedial y anterior ventral, que devuelven de nuevo la información a la corteza prefrontal. Esta vía corresponde a la ruta directa mencionada anteriormente. En la vía indirecta, el GPe y la porción ventromedial del STN se interpone entre el cuerpo estriado y el GPi. Aquí, el papel que ejerce la dopamina en el control de la cognición radica en que promueve al individuo a razonar y pensar las posibilidades, estrategias o herramientas que puede emplear para poder llegar a la recompensa, desde una perspectiva planificada.^{50, 60, 62, 63}

1.5.4.3. Vía CSTC límbica

El circuito límbico comienza en la porción anterior del cíngulo (área 24) y la corteza orbitofrontal, lo cual proyecta al área límbica (es decir, ventral) del cuerpo estriado. Esta zona comprende las regiones ventrales del núcleo caudado y el putamen y el núcleo accumbens. El cuerpo estriado ventral también tiene conexiones aferentes desde la amígdala, el hipocampo y la corteza entorrinal. Sus conexiones eferentes proyectan al globo pálido ventral que actúa como un relevo hacia el núcleo dorsomedial del tálamo. El circuito límbico contiene también una vía indirecta en la que el GPe y la parte rostral del STN intervienen entre el estriado ventral y el GPi. Este circuito está involucrado en los aspectos motivacionales de la conducta. Al igual que ocurre para las dos vías antes mencionadas, la liberación de dopamina termina inhibiendo la vía indirecta y estimulando la vía directa. Esto promueve la búsqueda de la recompensa desde un estado motivacional e incluso

emocional, dónde los recuerdos o cualquier otra clave ambiental que recuerde a una recompensa agradable anteriormente consumida, evocará su búsqueda por la liberación de dopamina (Fig. 7).^{50, 60, 62, 63}

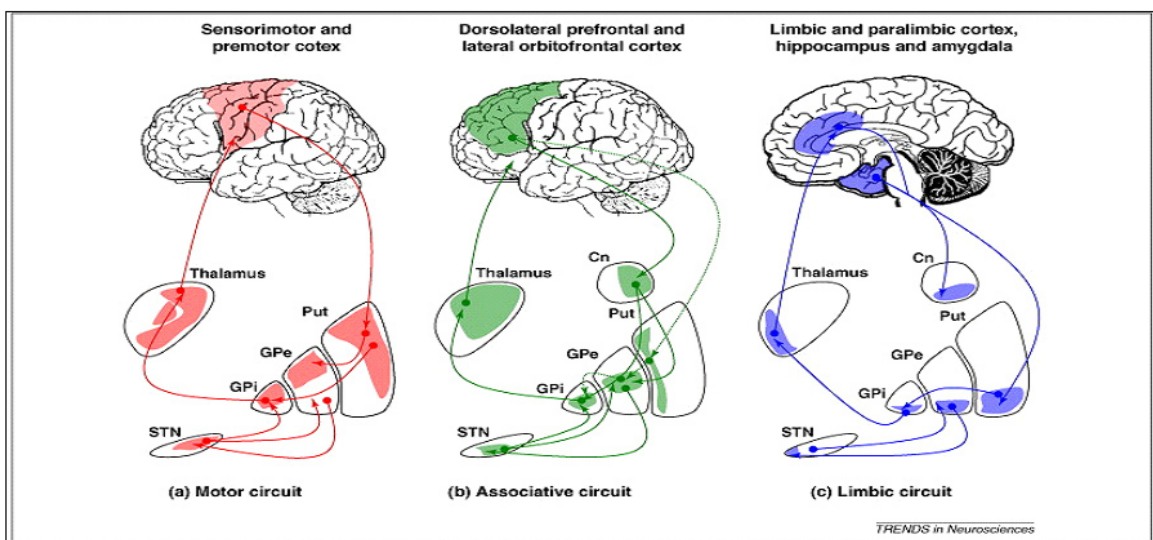


Fig. 7. Representación esquemática de los tres loops relacionados con la percepción y búsqueda de la recompensa. (a) Circuito motor. Las neuronas de la corteza sensoriomotora y motora proyectan al putámen posterolateral (Put). Desde el putámen hay dos proyecciones principales organizadas topográficamente en la región posterolateral de los núcleos blancos: (i) el circuito directo con proyección al GPi y (ii) el circuito indirecto que conecta el putámen posterior a la pars del globus pallidus externo (GPe), al STN y de vuelta al GPi. El GPi es el núcleo principal de salida de los ganglios basales a la corteza a través del tálamo ventrolateral. (b) Circuito asociativo. Este circuito se origina en la corteza prefrontal dorsolateral y orbitofrontal lateral, que se proyectan hacia el núcleo caudado (Cn) y a la porción anteromedial del putámen. Desde el cuerpo estriado (Cn + Put) se proyecta a la región dorsomedial del GPi y a las partes anteromediales del GPe y el STN para converger también en el GPi y de vuelta a la corteza a través del núcleo ventral anterior del tálamo. (c) Circuito límbico. Este bucle comienza con proyecciones desde varias regiones límbicas y desde la porción anterior del cíngulo y la corteza orbitofrontal hacia el estriado ventral. Desde el estriado ventral hay proyecciones a la parte límbica del GPe y a la parte medioventral de STN y a la parte ventral GPi y de vuelta a la corteza a través del núcleo mediodorsal del tálamo.⁶²

Con todo lo anterior, el proceso de la obtención de una recompensa implica un estado de motivación (via límbica), una planeación de cómo obtenerla y cómo llegar a ella (vía asociativa) y la coordinación de movimiento necesario para alcanzar dicho fin (vía motora). En todos los casos, la liberación de dopamina ocasionada por las recompensas adictivas activa dichos circuitos.^{50, 64-68}

1.6. LAS ADICCIONES ALTERAN LA FUNCIÓN DEL SISTEMA DOPAMINÉRGICO EN EL CEREBRO

Como señalamos, se conoce a detalle que la exposición a drogas, alcohol o estímulos adictivos externos promueve la liberación de dopamina en el NAc.^{46, 69-72} El NAc representa una estructura predilecta que se activa por dopamina y que causa en el humano y en los animales el impulso de la búsqueda de la recompensa y la ejecución motora para conseguirla. La función de este sistema se compromete durante el desarrollo de adicción a las drogas.⁷³⁻⁷⁹

1.6.1. Disminución del DRD2 en el NAc impulsa la búsqueda de la recompensa durante la adicción

Empleando tomografía de emisión de positrones (PET) se ha demostrado que el estriado de sujetos con adicción presenta decremento en la cantidad de receptores de dopamina tipo D2, cuando se comparan con personas no adictas.^{40, 80} Los estudios en animales indican que la exposición crónica, pero no la aguda, a las drogas produce disminución del DRD2 en el estriado, tanto dorsal como ventral. En general, se cree que se promueve la acción exacerbada de los DRD1 en el estriado en la vía directa, por el decremento de los DRD2, induciendo la impulsividad a nivel emocional y a nivel motor para conseguir la recompensa, a pesar de las consecuencias negativas que conlleva esta conducta.⁸¹⁻⁸⁴

Además, el receptor DRD2 puede regular la síntesis de la TH (enzima que sintetiza a la dopamina) a nivel del soma de la neuronal y la liberación del neurotransmisor dopamina, siendo que si la expresión del gen del receptor DRD2 disminuye, la producción y la misma síntesis de dopamina pudieran favorecerse, con una mayor producción de la enzima TH, promoviendo la activación de la neurotransmisión dopaminérgica exacerbada.⁸⁵⁻⁸⁹

Con el fin de comprender las bases moleculares y fisiológicas para el desarrollo de conductas adictivas, se han diseñado modelos animales de experimentación que pretenden reproducir los signos o síntomas asociados con la condición psicopatológica de un evento adictivo, así como el proceso de la abstinencia o de la recaída.^{90, 91} Una prueba conductual

muy empleada para identificar y cuantificar la preferencia hacia un estímulo externo se conoce como “prueba de preferencia de lugar”. En esta prueba se utiliza una caja conductual la cual consta de tres compartimientos, un compartimiento central y dos compartimientos en los extremos, un compartimiento del extremo es luminoso y el otro es oscuro, además de que el piso de cada compartimiento es diferente. En este sistema se coloca el estímulo adictivo en el compartimiento luminoso y se le permite al animal decidir estar en este sitio o bien escoger el compartimiento oscuro. Se ha demostrado que bajo estas condiciones el animal se localiza en el compartimiento luminoso, sin importarle este entorno aversivo, ya que relaciona dicho compartimiento con la droga. Esto se asemeja con la conducta adictiva del ser humano, en dónde sin importarle el daño o el entorno aversivo existente, decide moverse hacia aquello que se relaciona con la droga.^{92, 93}

Está comprobado que muchas drogas producen un cambio de preferencia de lugar. Entre las que podemos nombrar a una amplia variedad, como lo es la cocaína, las metanfetaminas, el alcohol, la nicotina y morfina.⁹⁴⁻⁹⁷ Regularmente, estos resultados demuestran que las drogas producen un cambio de preferencia de lugar estadísticamente significativo en los roedores que se les administra la droga en investigación. Este mismo comportamiento se presenta en roedores expuestos a comida apetecible, mostrando un cambio de preferencia de lugar hacia el del estímulo adictivo.^{42,93,98} Sin embargo, aún se desconoce si tales cambios conductuales pueden encontrarse durante la exposición de comida alta en grasa en roedores.

Por consiguiente este trabajo contribuirá a determinar si la exposición a comida alta en grasa en ratones induce la preferencia adictiva a su consumo evidenciado por la prueba de preferencia de lugar y si tal comportamiento correlaciona con el decremento en los niveles del receptor D2 de la dopamina en el NAc.

CAPÍTULO II. JUSTIFICACIÓN

Ante la falta de información contundente para definir a la comida como un elemento adictivo y del papel de la neurotransmisión dopaminérgica para modular el consumo de alimentos hipercalóricos, nuestro trabajo contribuirá a entender si el decremento de los niveles del receptor D2 de dopamina en el NAc, puede asociarse con el inducir la ingesta descontrolada de comida apetecible y el desarrollo de obesidad en ratones.

CAPITULO III. OBJETIVO GENERAL

Determinar si los ratones con adicción y/o preferencia a la ingesta de comida grasa presentan decremento en el nivel de expresión del gen del receptor D2 de dopamina.

3.1. Objetivos específicos

- 1.- Determinar el incremento de peso y en el consumo de comida de ratones expuestos a dieta grasa.
- 2.- Determinar la adicción y/o preferencia a la ingesta de comida grasa en ratones no obesos.
- 3.- Cuantificar el nivel de expresión del gen del receptor d2 en el núcleo accumbens Shell (NAc Shell) de ratones con adicción y/o preferencia a la ingesta de comida grasa.

CAPÍTULO IV. HIPÓTESIS

La exposición a ratones a comida alta en grasa produce una conducta adictiva y correlaciona con la disminución del DRD2 en la región del núcleo accumbens Shell (NAc Shell), una parte cerebral encargada de la percepción hedónica de las recompensas.

CAPITULO V. ESTRATEGIA GENERAL

Para cumplir con el Objetivo específico 1 se determinó el incremento de peso y el consumo de comida en ratones expuestos a dieta grasa. Después, se evaluó la adicción y/o preferencia a la ingesta de comida grasa en ratones no obesos por medio de la prueba de condicionamiento de preferencia de lugar. Esto con la finalidad de cumplir con el Objetivo específico 2. Por último, se cuantificó el nivel de expresión del gen del receptor D2 en el NAc de ratones con adicción y/o preferencia a la ingesta de comida grasa utilizando la técnica de PCR en tiempo real (PCRq), para cumplir con el Objetivo específico 3.

CAPITULO VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Material

6.1.1. Kit AllPrep ADN / ARN Mini – QIAGEN

Reactivo utilizado en la extracción de ARN. El kit consta de varios componentes (Tabla 2).

Otros reactivos utilizados y que el kit no proporciona son los siguientes: solución de β -mercaptoethanol (β -ME) al 14.3 M, etanol al 96–100% y soluciones de limpieza y esterilidad como lo es el alcohol al 70% y el dodecilsulfato de sodio (SDS).

Tabla 2. Componentes del Kit AllPrep ADN / ARN Mini – QIAGEN.

CONTENIDO DEL KIT	
Catalago no.	80004
Número de preparaciones	50
Mini Columnas de Centrifugación AllPrep DNA (sin color) (cada una en un Tubo de Colección de 2 mL)	50
Mini Columnas de Centrifugación AllPrep RNeasy (rosa) (cada una en un Tubo de Colección de 2 mL)	50
Tubos de Colección (1.5 mL)	100
Tubos de Colección (2 mL)	150
Buffer RLT*	45 mL
Buffer RW1*	45 mL
Buffer RPE ⁺ (concentrado)	11 mL
Agua libre de ARN-asas	10 mL
Buffer AW1* ⁺ (concentrado)	19 mL
Buffer AW2 ⁺ (concentrado)	13 mL
Buffer EB	22 mL
* Contiene una sal de guanidina. No compatible con desinfectantes que contienen blanqueador.	
⁺ Poner la cantidad apropiada de etanol (96-100%) como se indica en la botella.	

6.1.2. Kit High-Capacity cDNA Archive – Applied Biosystems

Utilizado para la conversión del ARN a cDNA. El kit contiene varios reactivos (Tabla 3).

Otros reactivos utilizados y que la kit no proporciona son los siguientes: agua libre de nucleasas y soluciones de limpieza y esterilidad.

Tabla 3. Reactivos del Kit High-Capacity cDNA Archive – Applied Biosystems.

CONTENIDO DEL KIT	
COMPONENTE	CANTIDAD
Buffer RT 10X, 1.0 mL	2 tubos
Primers aleatorios RT 10X, 1.0 mL	2 tubos
dNTPs 25X, 1.0 mL	1 tubo
Reversa Transcriptasa MultiScribe™ 50 U/ μ L, 1.0 mL	1 tubo

6.1.3. Kit SYBR® Green PCR Master Mix– Applied Biosystems

Utilizado para la realización de la técnica de PCRq.

El reactivo contiene los siguientes componentes: SYBR® Green I Dye, la AmpliTaq Gold® DNA polimerasa, los dNTPs con dUTP, la Referencia Pasiva, y los componentes del buffer optimizados.

Otros reactivos utilizados y que la kit no proporciona son los siguientes: agua libre de nucleasas y soluciones de limpieza y esterilidad.

6.1.4. Primers

A continuación se presentan las características de los primers empleados para la realización de la PCRq (Tabla 4).

Tabla 4. Características de los primers utilizados.

	Para el gen ACTB	Longitud	Tm (°C)	% CG	Longitud del producto
F	5'-GCTCTGGCTCCTAGCACCAT-3'	20	61.69	60	75 pb
R	5'-GCCACCGATCCACACAGAGT-3'	20	62.17	60	
	Para el gen receptor de dopamina d2	Longitud	Tm (°C)	% CG	Longitud del producto
F	5'-AGGATGTGCGTGATGAAGAAG-3'	20	57.97	50	146 pb
R	5'-CAGAAGGAGAAGAAAGCCACT-3'	20	60.46	60	

El par de primer para medir el nivel de expresión del gen DRD2 se adquirieron directamente de una tienda comercial que fabrica primers para análisis de PCRq denominada IDT (Integrated DNA Technologies). Los primers usados para medir el nivel de expresión del gen endógeno ACTB fueron mandados a sintetizar a la casa comercial PROBIOTEK y la secuencia de dicho par de primers fueron obtenidas de una referencia bibliográfica.⁹⁹

6.1.5. Animales

Se emplearon 23 ratones macho de la cepa C57BL/6 de 40- 60 días de edad y con 15-20 g de peso. Las condiciones de cautiverio fueron ciclos de luz/oscuridad de 12 hrs/12hrs y temperatura del cuarto de 24 °C. Antes de iniciar los experimentos, los ratones se mantuvieron en el laboratorio con agua y comida control (Chow) *ad libitum*.

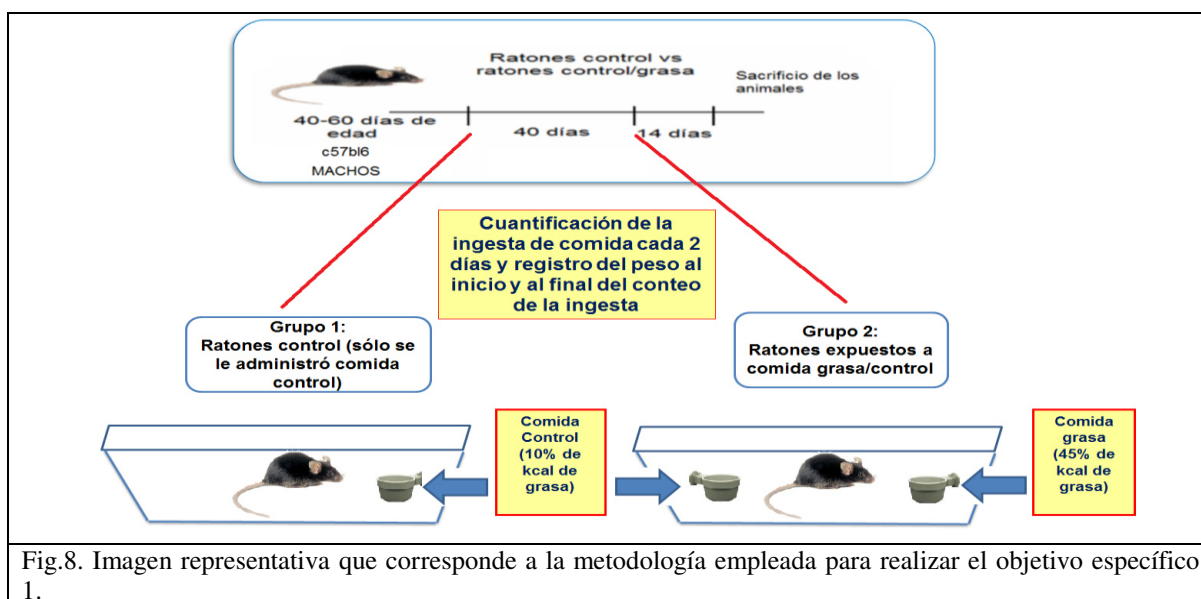
6.1.6. Dietas empleadas en el estudio

Para nuestro experimento se emplearon dos tipos de alimentos: alimento control bajo en grasa (10% de kcal de grasa) y alimento alto en grasa (45% de kcal de grasa). Los alimentos fueron proporcionados a través de colaboración con el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran (Dr. Armando Tovar).

6.2. Método

6.2.1. Exposición de los ratones a dieta alta en grasas y dieta control

Se colocaron los ratones en cajas individuales durante siete días. Se dividieron los ratones en dos grupos. El Grupo 1 recibió sólo alimento bajo en grasa, mientras que el Grupo 2 recibió alimento alto en grasa y alimento bajo en grasa. Los ratones del Grupo 2 tenían la opción de comer alimento bajo o alto en grasa. Se les proporcionaba aproximadamente 4.5 gramos cada dos días. Se cuantificó la ingesta de comida de cada tipo de comida (baja o alta en grasa para el Grupo 2 o baja en grasa para el Grupo 1) para cada ratón, cada dos días durante cuarenta días. Se cuantificó el peso inicial y el peso final de ambos grupos después de los cuarenta días de experimento. Después de los cuarenta días se realizó la prueba conductual de preferencia de lugar, tal y como se indica en la Fig. 8.



6.2.2. Prueba de preferencia de lugar

Para llevar a cabo la prueba de condicionamiento de lugar, se utilizó una caja comercial la cual consta de tres compartimientos: un compartimiento central y chico (9 X 30 X 32cm) y dos compartimientos a los extremos (30 X 30 X 32cm) (Fig. 9). La caja tiene un compartimiento luminoso y con piso liso de barras delgadas, de forma cilíndrica, de aproximadamente 0.5 cm de ancho, separadas de igual manera por aproximadamente 1 cm entre ellas. El compartimiento del lado contrario es oscuro con piso de barras de acero de formas rectangulares con 1 cm de ancho y 1 cm de separación entre ellas que corren de forma paralela de extremo a extremo de la caja. Las barras corren de forma paralela de un extremo a otro del compartimiento luminoso, pero de forma contraria al otro compartimiento oscuro.

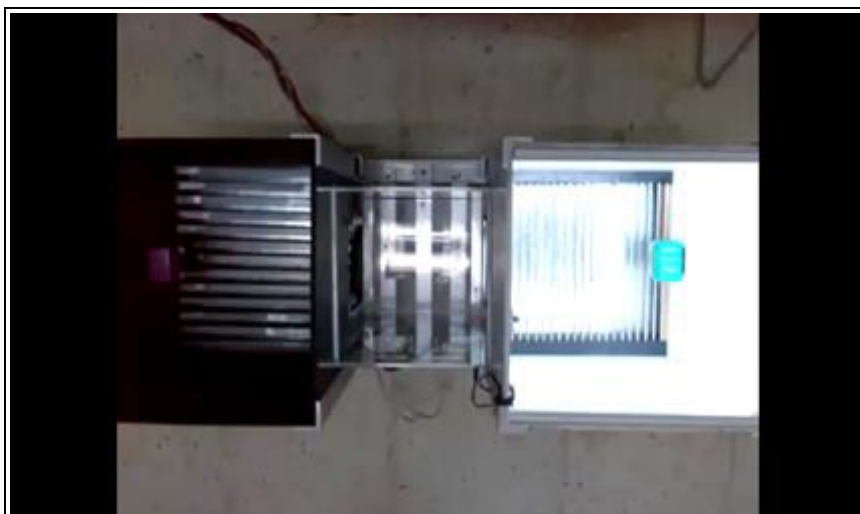


Fig. 9. Caja conductual en dónde se llevó a cabo la prueba de condicionamiento de lugar. Se compone de tres compartimientos, los cuales difieren en su piso, además el compartimiento central es más pequeño que los laterales y un compartimiento lateral presenta un estímulo aversivo para el ratón (es luminoso) mientras que el otro no lo presenta (es oscuro).

Posterior a la exposición de los grupos de ratones a la comida, se inició la prueba de condicionamiento de lugar (Fig. 10). La prueba se divide en tres etapas que duran catorce días de tiempo total. La primera etapa se denomina el día del pre-condicionamiento (día 1), la segunda etapa es la etapa del condicionamiento (días 2 al 13), y por último la etapa de prueba de preferencia de lugar (día 14). Todas las sesiones por día tuvieron una duración de 20 min.

6.2.2.1. 1er día. Pre condicionamiento

La caja en la que se llevó a cabo el ensayo está compuesta por dos cámaras, una oscura y una clara que estuvo iluminada durante el ensayo, además de un pasillo central donde el ratón tuvo libre acceso a las dos cámaras.

Se colocó al ratón en el compartimento que se encuentra en medio de la cámara luminosa y la oscura, con las puertas cerradas. Las cámaras no contenían alimento. Se abrieron las puertas para permitir que el ratón tuviera libre acceso a las dos cámaras, se midió el tiempo que permaneció en cada una durante 20 min. En la mayoría de los casos el ratón tuvo preferencia por permanecer en el compartimento oscuro.

6.2.2.2. Día 2 al 13. Condicionamiento

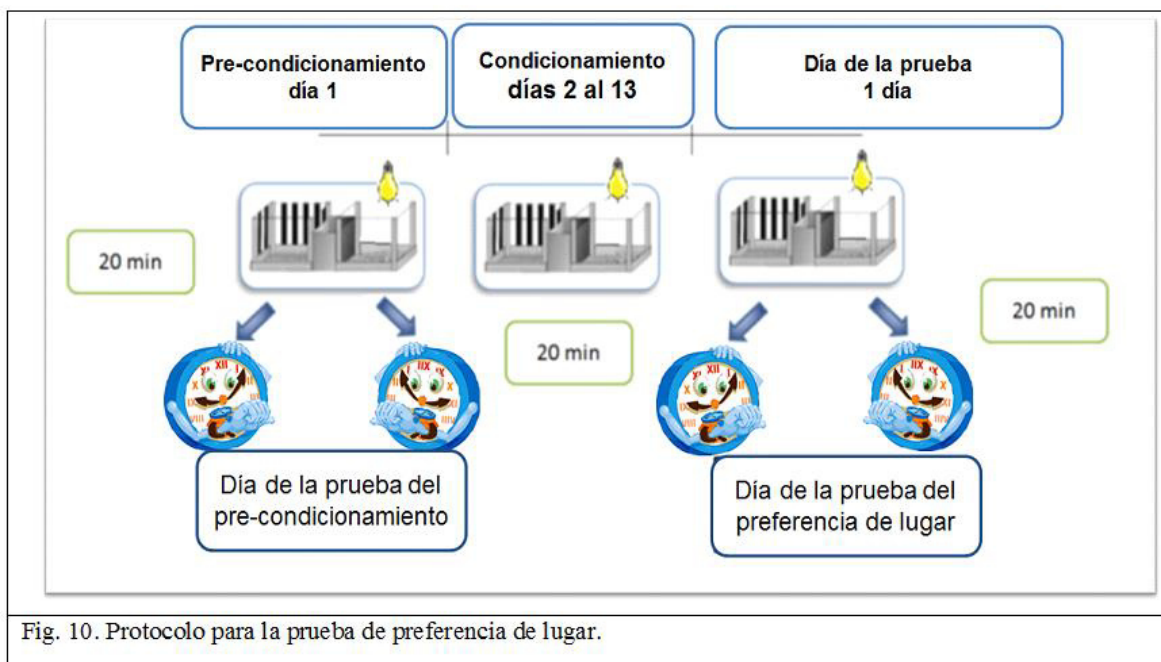
Cada ratón permaneció durante 6 días en la cámara luminosa y al igual 6 días en la cámara oscura con la puerta cerrada durante 30 min en días alternativos. Los animales tuvieron acceso a dieta grasa en el compartimento que permanecieron por menor tiempo y dieta control en el compartimento que permanecieron por más tiempo.

A los ratones control se les colocó igualmente dieta control en la cámara luminosa y oscura durante los 12 días, no tuvieron acceso a dieta grasa durante todo el experimento.

6.2.2.3. Día 14. Prueba de Preferencia de lugar

Se colocó al ratón en el compartimento que se encuentra en medio de la cámara luminosa y la oscura con las puertas cerradas. Se abrieron las puertas permitiendo al ratón libre acceso a las dos cámaras, se midió el tiempo que permanecieron en cada una durante 20 min.

Luego se comparó el tiempo que el ratón permaneció en cada compartimento el día de la prueba de preferencia en comparación con el primer día de pre condicionamiento. Si el ratón cambio de preferencia y ahora permaneció en la cámara que originalmente no era de su agrado, se le puede considerar al ratón como adicto.



El análisis de preferencia de lugar que presentaron los ratones se obtuvo restando el tiempo registrado en el compartimiento luminoso el día de la prueba de preferencia, al tiempo que permaneció en el compartimiento luminoso el día del pre-condicionamiento. Esto mismo se hace con el tiempo registrado en el compartimiento oscuro. Un aumento en el tiempo en el compartimiento luminoso es indicativo de preferencia por consumir comida grasa y probable conducta adictiva, comparado con el Grupo 1 (controles).

6.2.3. Disección de tejidos cerebrales

Posterior al término de la prueba de preferencia de lugar, se inició la disección de regiones cerebrales. Se empleó el Atlas de Paxinos y Watson (1985), y un equipo de disección para identificar y disecar, respectivamente, el núcleo accumbens Shell (NAc Shell) de ratones, una región del NAc relacionada con la percepción hedónica de las recompensas.

6.2.4. Extracción de ARN

Se utilizó el Kit AllPrep ADN / ARN Mini – QIAGEN, puntillas de filtro estériles, pipetas, centrífuga, así como soluciones de limpieza como SDS y alcohol al 70%. Para la homogenización del NAc Shell se utilizó un homogeneizador de pistilo de vidrio. La

extracción de ARN se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (<http://www.lifebiotechnology.org/genomics/EN-AllPrep-DNARNA-Mini-Handbook.pdf>)

6.2.5. Conversión de ARN a cDNA empleando retrotranscripción

Se utilizó el Kit High-Capacity cDNA Archive – Applied Biosystems, puntillas de filtro estériles, pipetas, agua libre de nucleasas, así como soluciones de limpieza como SDS y alcohol al 70%. Se emplearon 200 ng de ARN para iniciar la reacción de retrotranscripción. La conversión de ARN a cDNA se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_041198.pdf).

A continuación, en las tablas de abajo, se presentan la cantidad (μL) de cada uno de los reactivos utilizados que el kit proporciona para la conversión de una sola muestra y la temperatura de los ciclos empleados para llevar a cabo dicha conversión.

Tabla 5. Protocolo para la preparación de un volumen de reacción.

COMPONENTE	Volumen (μL) / Reacción
Buffer RT 10X	2 μL
Primers aleatorios RT 10X	2 μL
dNTPs 25X	0.8 μL
Reversa Transcriptasa MultiScribe™ 50 U/ μL	1 μL
H ₂ O libre de Nucleasas	Variado
Cdna	Variado
Volumen total para una reacción	20 μL

Tabla 6. Condiciones de programación en el termociclador.

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	25	37	85	4
Tiempo	10 min	120 min	5 min	∞

6.2.6 Reacción de PCR en tiempo real

Se emplearon 500 ng de cDNA para iniciar la reacción de PCR en tiempo real. Para cada conjunto de reacciones se emplearon los primers descritos en la Tabla 1 y el kit SYBR® Green PCR Master Mix– Applied Biosystems que contiene los componentes de reacción, como lo es el SYBR® Green I Dye, la AmpliTaq Gold ® DNA polimerasa, los dNTPs con dUTP, la Referencia Pasiva, y los componentes del buffer optimizados. Las condiciones de reacción fueron de 10 min a 95 $^{\circ}\text{C}$ en el paso 1 para desnaturalizar completamente la

muestra, y pasar al paso 2, donde la temperatura de desnaturalización fue de 92°C por 30 s y la temperatura de alineamiento y extendido de 60°C por 1 min. Este paso 2 se repitió 40 veces.

Se evaluaron los niveles de expresión de los genes DRD2 y ACBT como gen endógeno empleando PCR en tiempo real para cuantificar su transcripción. Las muestras se corrieron por triplicado empleando 300 ng de cDNA para iniciar la reacción. Los análisis se realizaron empleando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

6.2.7. Análisis estadístico

Para saber si hubo o no un aumento de peso en los grupos de animales empleados de manera significativa, se recurrió a la prueba T-student, con un valor de $p < 0.05$ utilizando el programa SPSS.

CAPÍTULO VII. RESULTADOS

7.1. Objetivo específico 1. Determinar el incremento en el peso y consumo de comida de ratones expuestos a dieta grasa

En la Fig. 11 se muestra las medias de la ingesta de comida control (Grupo 1) y comida control y grasa (Grupo 2) durante los 40 días de exposición a las dietas.

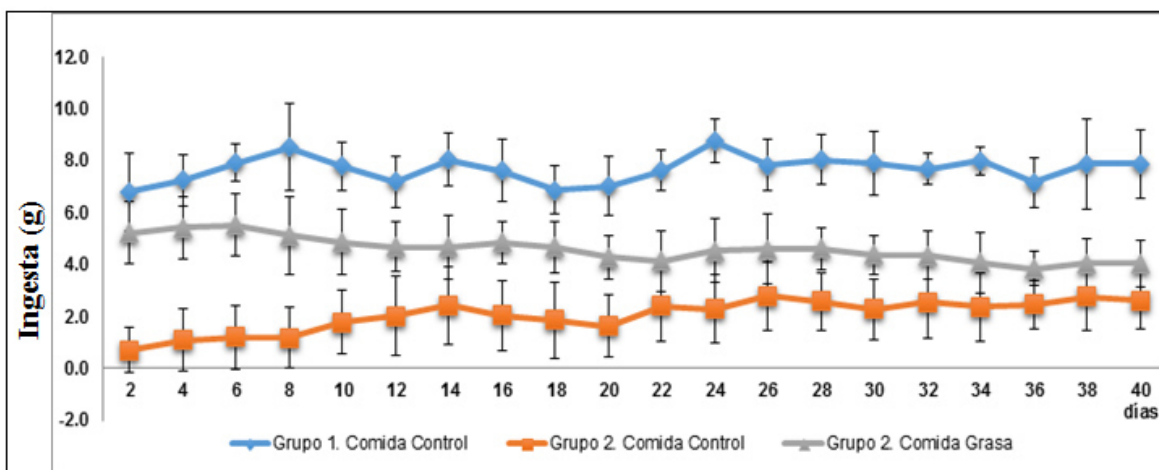


Fig. 11. Los ratones se expusieron a comida baja en grasa (Grupo 1) o comida baja y alta en grasa (Grupo 2). La ingesta de comida se determinó cada 2 días durante los 40 días que duró la prueba. $n = 23$. La gráfica representa el promedio \pm DE de los datos.

Los datos demuestran que los ratones prefieren la ingesta de comida alta en grasas comparado con la ingesta de comida control (Grupo 2). Sin embargo, la ingesta de comida grasa decrece con el paso del tiempo. Por su parte, en los ratones del Grupo 1, la ingesta de comida baja en grasas no presentó alteraciones al paso del tiempo.

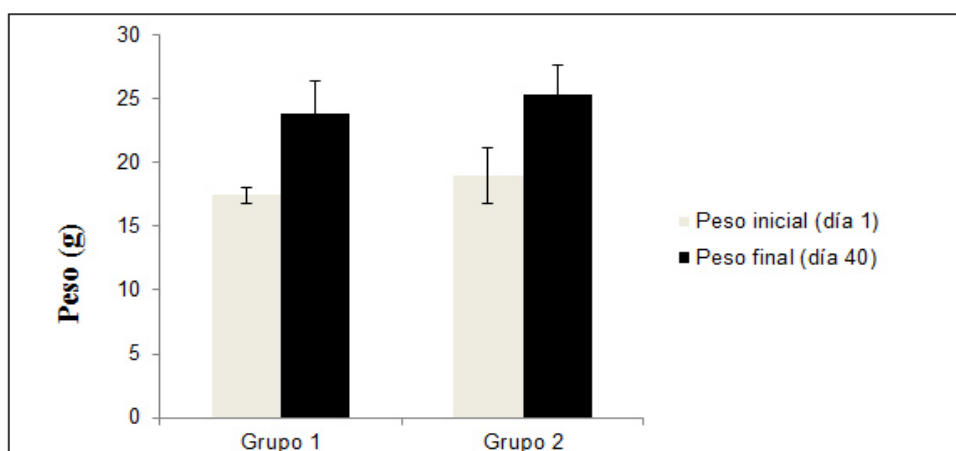


Fig.12. Los ratones expuestos sólo a comida control (Grupo 1) y aquellos expuestos a comida control y a comida grasa (Grupo 2) se pesaron y se cuantificó el peso corporal al inicio y al final del experimento. $n = 23$. La gráfica representa el promedio \pm DE de los datos.

El análisis del peso de los dos grupos de ratones empleados en nuestro estudio demostró que la ingesta de dieta grasa en el Grupo 2 no modifica el peso de los ratones al final del experimento, cuando se compara con el Grupo 1, quienes únicamente consumieron comida baja en grasa (Fig. 12).

7.2. Objetivo específico 2. Determinar la adicción y/o preferencia a la ingesta de comida grasa en ratones no obesos

Los resultados indican que el 47% de los ratones expuestos a comida grasa (Grupo 2) presentaron un cambio de preferencia de lugar del compartimiento oscuro al compartimiento luminoso de forma significativa (Fig. 13, 14, 16). El 53% de los ratones, a pesar de presentar incremento en el consumo de comida grasa, no prefieren localizarse en el compartimiento luminoso.

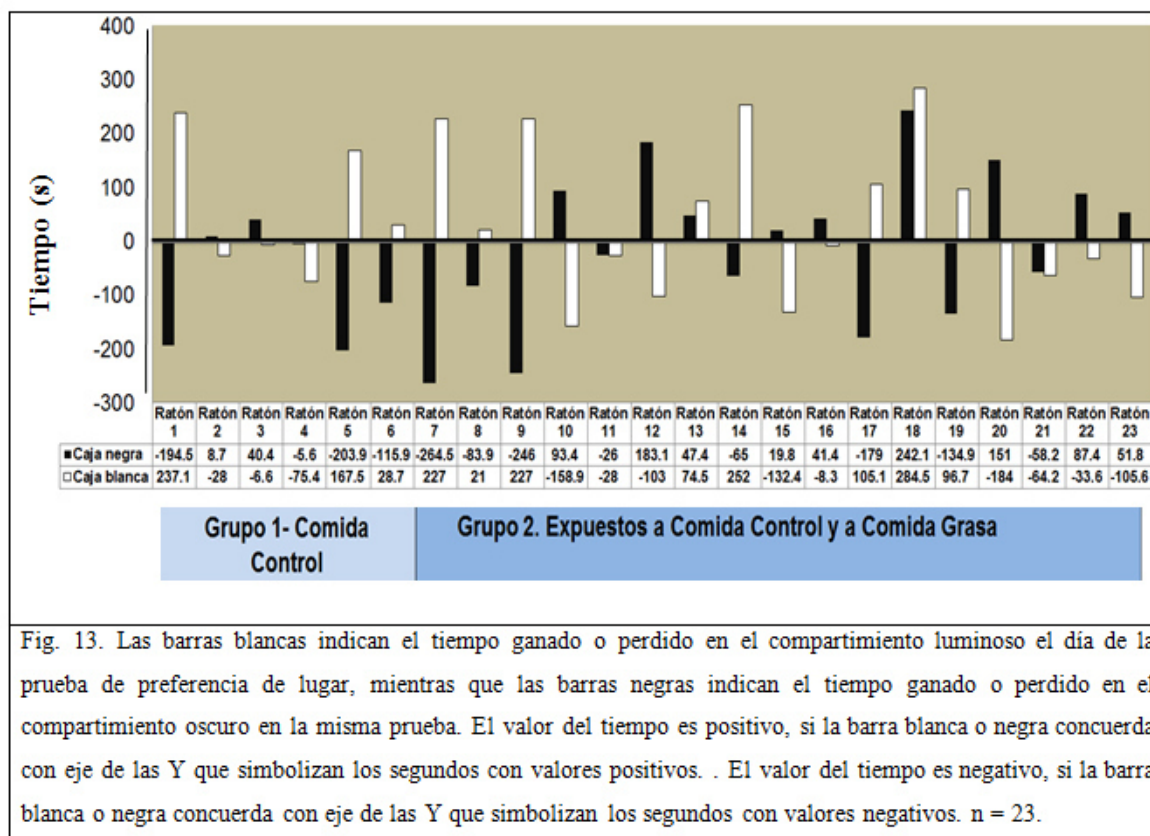
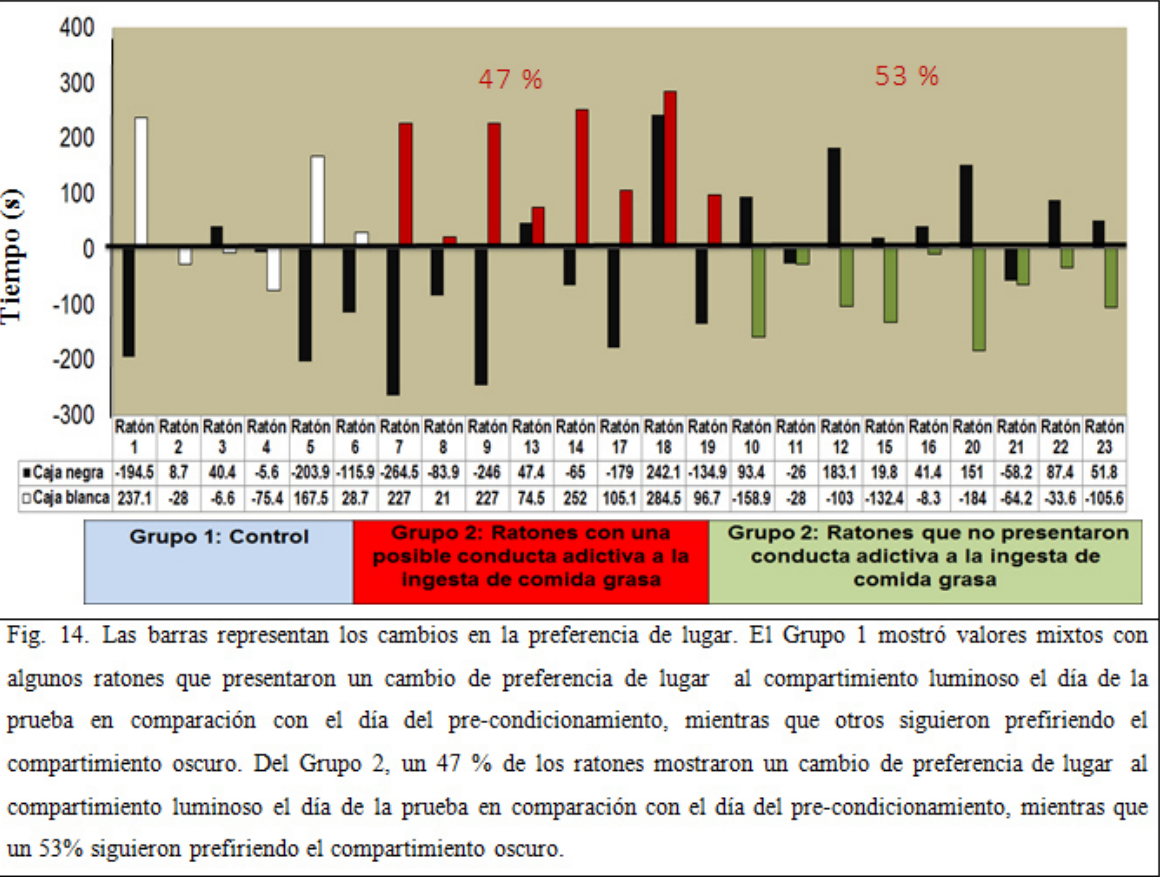


Fig. 13. Las barras blancas indican el tiempo ganado o perdido en el compartimiento luminoso el día de la prueba de preferencia de lugar, mientras que las barras negras indican el tiempo ganado o perdido en el compartimiento oscuro en la misma prueba. El valor del tiempo es positivo, si la barra blanca o negra concuerda con eje de las Y que simbolizan los segundos con valores positivos. . El valor del tiempo es negativo, si la barra blanca o negra concuerda con eje de las Y que simbolizan los segundos con valores negativos. n = 23.

Nuestros resultados indican la presencia de tres grupos de animales experimentales. A saber: el Grupo 1 (control), el grupo de animales que mostró preferencia por el compartimento luminoso (Grupo 2) y el grupo de animales que mostró preferencia por el compartimento oscuro (Grupo 2). Con ello, decidimos comparar las ingestas de comida grasa en estos tres grupos de animales con la finalidad de correlacionar la probable adicción a la comida con la preferencia de lugar al compartimento luminoso.



Los resultados analizados en los ratones adictos contra los no adictos, mostraron claramente que el grupo de ratones con conducta adictiva hacia la comida alta en grasa mantiene la ingesta preferencial y elevada del alimento hipercalórico, mientras que el grupo de ratones que no tuvieron una conducta adictiva muestra, notablemente, la disminución a dicho alimento conforme pasaba el tiempo (Fig. 16, 17). Por último es menester mencionar que los ratones controles no mostraron alteraciones en su ingesta de comida baja en grasa a lo largo de los 40 días.

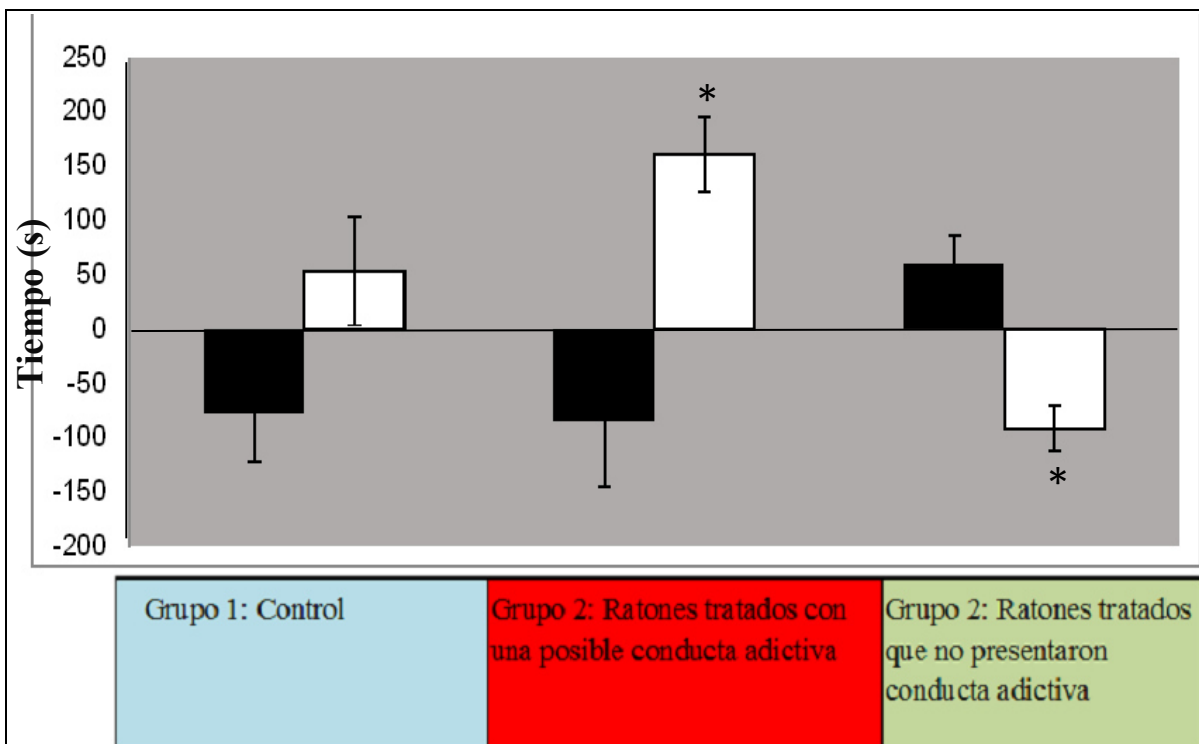


Fig. 15. El Grupo 2 que mostró un cambio de preferencia de lugar al compartimiento luminoso el día de la prueba en comparación con el día del pre-condicionamiento, lo hizo de forma significativa cuando se compara con el Grupo 1 o control. Mientras que el Grupo 2 que no mostró un cambio de preferencia de lugar al compartimiento luminoso el día de la prueba en comparación con el día del pre-condicionamiento, mostró una disminución de dicho tiempo de forma significativa si se compara con el Grupo 1 o control. A partir de estos datos se dedujo que ratones presentaban una conducta adictiva hacia la comida alta en grasa. Grupo 1, $n = 6$. Grupo 2 con conducta adictiva, $n = 8$. Grupo 2 sin conducta adictiva, $n = 9$. La gráfica representa el promedio \pm DE de los datos. $p < 0.05$ después de aplicar la prueba de T de student.

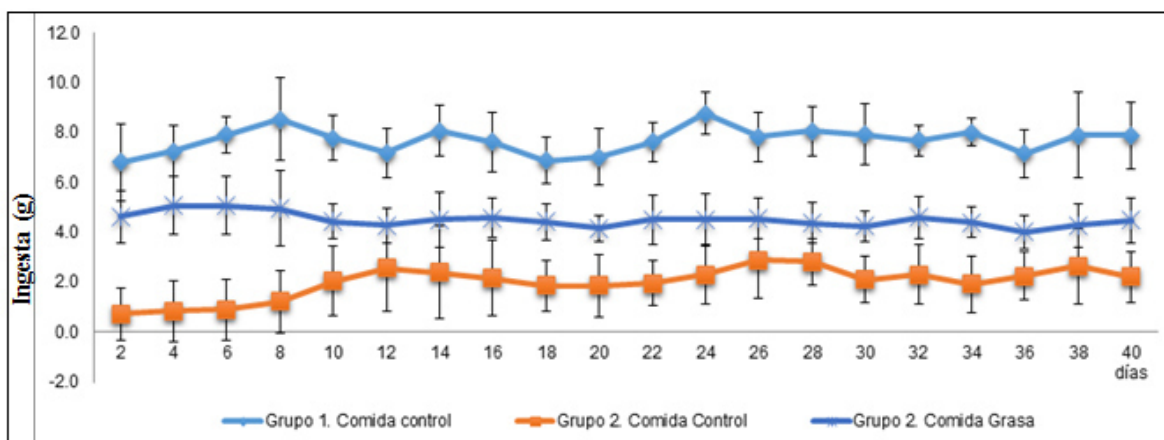


Fig. 16. Los ratones se expusieron a comida baja en grasa (Grupo 1) o comida baja y alta en grasa (Grupo 2). La ingesta de comida se determinó cada 2 días durante los 40 días que duró la prueba. Nótese que El Grupo 2 de ratones que mostró una conducta adictiva presenta un consumo constante y elevado de la ingesta de comida alta en grasa (línea azul) y un bajo consumo de la ingesta de comida baja en grasa (línea anaranjada) a lo largo de los 40 días. $n = 8$. La línea celeste indica la ingesta de comida baja en grasa del Grupo 1 o control. $n = 6$. La gráfica representa el promedio \pm DE de los datos.

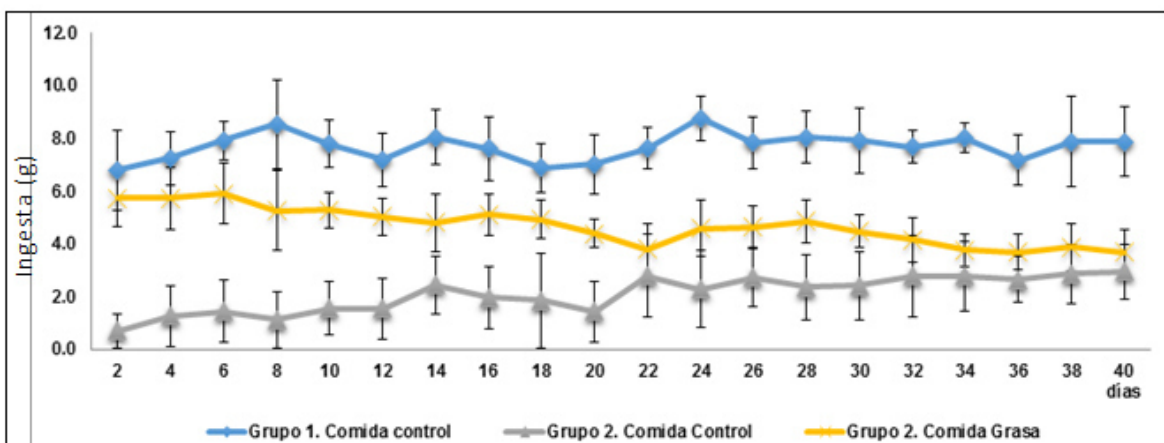
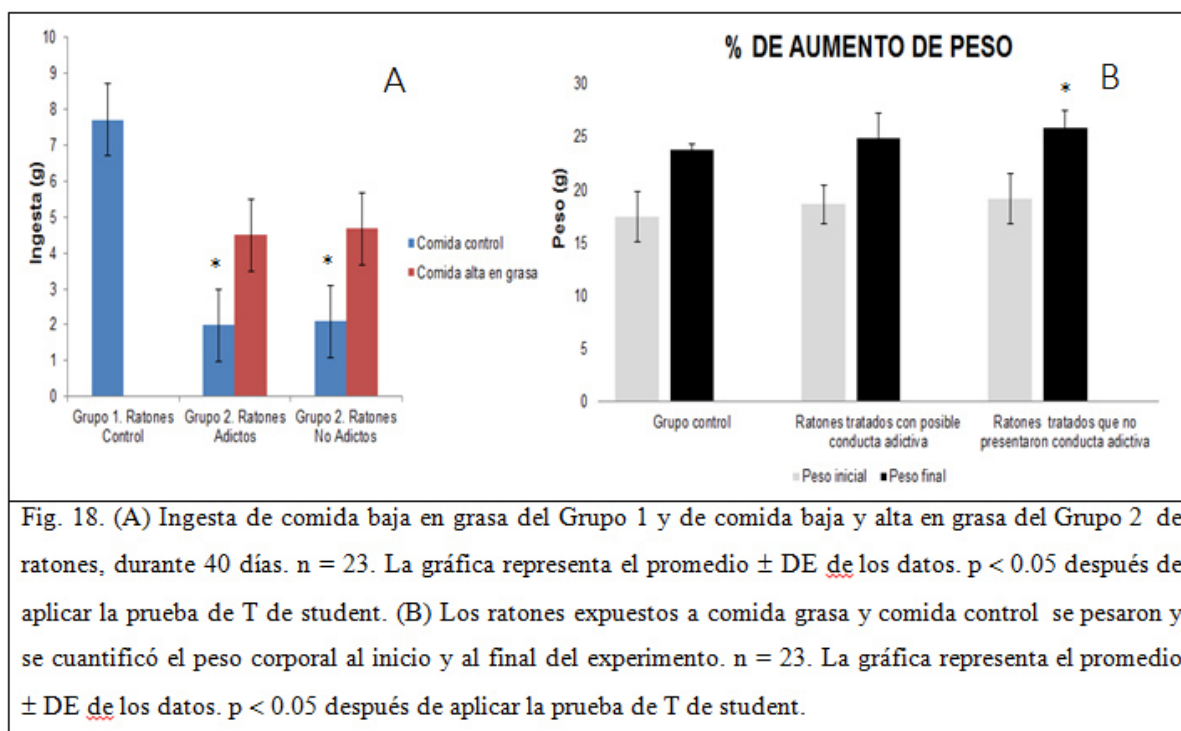


Fig. 17. Los ratones se expusieron a comida baja en grasa (Grupo 1) o comida baja y alta en grasa (Grupo 2). La ingesta de comida se determinó cada 2 días durante los 40 días que duró la prueba. Nótese que El Grupo 2 de ratones que no mostró una conducta adictiva presenta un consumo de comida grasa que decrece dependiente del tiempo (línea amarilla) a lo largo de los 40 días. $n = 9$. La línea celeste indica la ingesta de comida baja en grasa del Grupo 1 o control. $n = 6$. La gráfica representa el promedio \pm DE de los datos.

Al comparar el consumo de comida total (baja y alta en grasa) de estos tres grupos, como esperaba, se obtuvo que tanto los ratones adictos como los no adictos muestran incremento en la ingesta de comida grasa, sin presentar diferencias significativas entre ambos grupos (Fig. 18 A). Si se suma la ingesta de comida baja y alta en grasa de los ratones adictos y no adictos del Grupo 2, se demuestra que no difiere de la ingesta total de comida baja en grasa del Grupo 1 (Fig. 18 A). Analizando el peso ganado después de 40 días de exposición a dieta alta en grasa (Grupo 2), respecto al grupo control (Grupo 1), obtuvimos que los ratones que no presentaron conducta adictiva hacia la comida grasa mostraron ligero, pero significativo, incremento en el peso corporal, cuando se compararon con los ratones no adictos o ratones controles (Fig. 18 B).



7.3. Objetivo específico 3. Cuantificar el nivel de expresión del gen del receptor D2 en el NAc de ratones con adicción y/o preferencia a la ingesta de comida grasa.

Previo a la cuantificación de los niveles de cDNA del gen DRD2 y del gen endógeno ACTB, se realizaron curvas estándar, empleando diluciones sucesivas de las sondas, iniciando en 600 ng de forma descendente hasta una concentración final de 37.5 ng. La Fig.

19 y 20 presentan las pendientes y las curvas de disociación de los cDNAs de los genes DRD2 y ACTB.

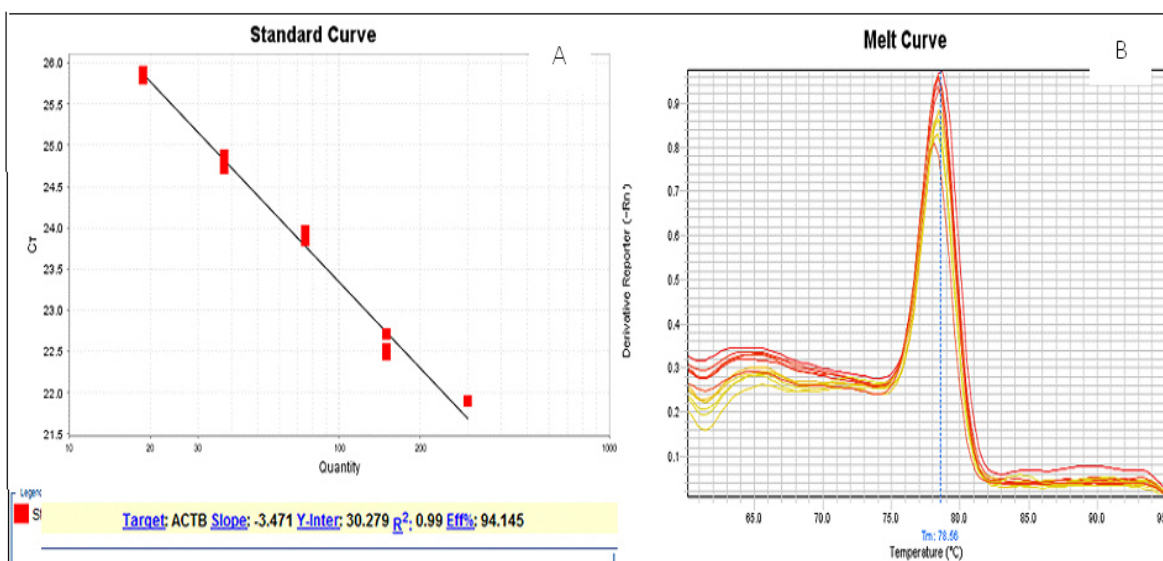


Fig. 19. (A) Nuestras curvas cumplieron con los valores de la eficiencia y r^2 adecuados. (B) Melt Curve de los ampliaciones del cDNA correspondientes a la expresión del gen ACTB.

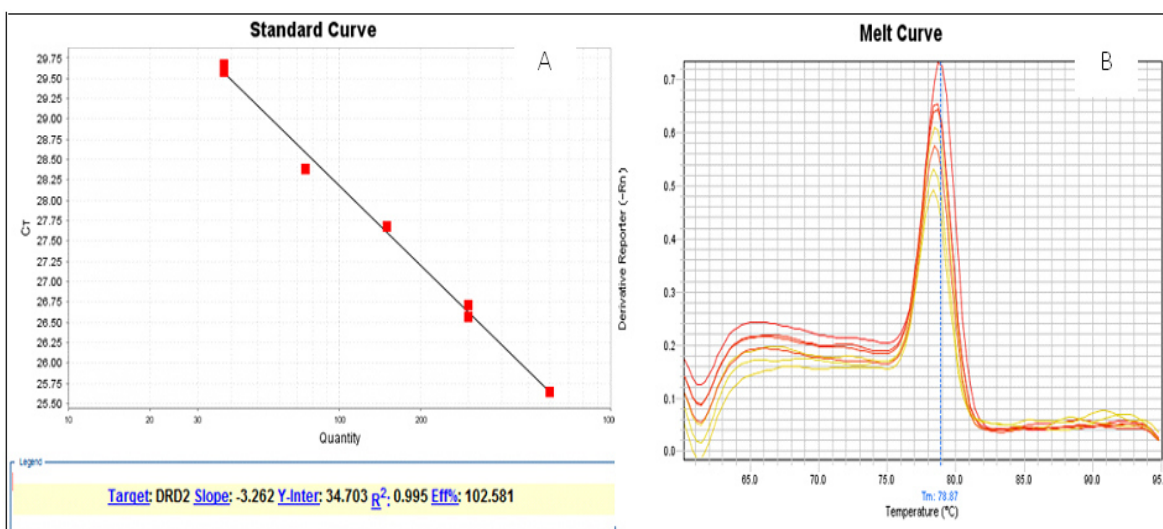
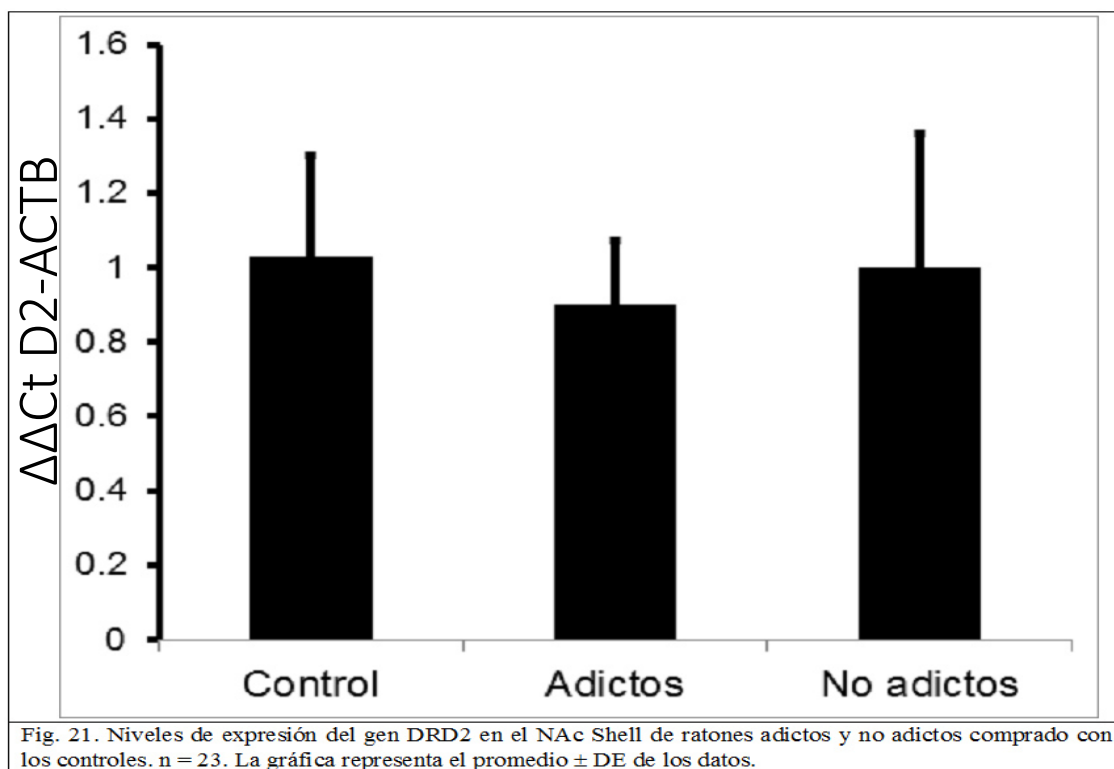


Fig. 20. (A) Nuestras curvas cumplieron con los valores de la eficiencia y r^2 adecuados. (B) Melt Curve de los ampliaciones del cDNA correspondientes a la expresión del gen DRD2.

Finalmente, se realizó el análisis de PCR en tiempo real de las muestras del NAc Shell de ratones controles, adictos y no adictos a la comida grasa. El análisis demuestra que no existen cambios en los niveles de expresión del gen DRD2 en el NAc Shell de ratones adictos comparado con ratones no adictos y controles (Fig. 21).



CAPÍTULO VII. DISCUSIÓN

El catalogar estrictamente al descontrol de la ingesta de comida como una adicción, ha resultado ser algo contradictorio y a veces refutado por algunos investigadores. Sin embargo, muchos estudios demuestran que existen patrones similares entre las personas que son adictas a una droga como en aquellas que buscan la ingesta de alimento de forma constante. En nuestro trabajo demostramos que los ratones estudiados presentan preferencia por consumir comida hipercalórica respecto a comida control. Esto concuerda con algunos estudios confirmando el consumo de comida apetecible, respecto a comida control en roedores,⁴² e inclusive se observa durante la exposición a drogas empleando la misma especie animal.⁶⁹⁻⁷² De interés, demostramos que la ingesta de comida grasa decrece dependiente del tiempo. Esto coincide con el hecho de que en algunos trabajos se ha demostrado el decremento de la liberación del neurotransmisor dopamina en el NAc durante la exposición crónica de comida,¹⁰⁰ por lo que es posible que el decremento en la preferencia por consumir comida grasa se asocie a un decremento en la liberación del neurotransmisor.

Para determinar si la exposición a la comida grasa induce adicción a su consumo, recurrimos a la prueba de preferencia de lugar, empleada ampliamente en los estudios de adicción a las drogas⁹⁴⁻⁹⁷ y en algunos reportes para probar preferencia por la comida.^{42,93,98} Esta prueba implica la asociación de un entorno negativo con la exposición a la droga, comparado con la asociación a un entorno gratificante con la ausencia de la droga, de manera que si el animal prefiere el consumo del estímulo gratificante, lo consumirá a pesar del entorno negativo al que estará expuesto. Nuestros resultados indican que el 47% de los ratones mostraron un cambio de preferencia de lugar hacia el compartimiento luminoso el día de la prueba (entorno negativo), mientras que un 53% de nuestros ratones no mostró dicha conducta. De manera notable, sólo los ratones que mostraron preferencia por el compartimiento luminoso mantuvieron la ingesta de comida grasa a lo largo de los 40 días de la prueba. Por su parte, el grupo de ratones sin preferencia al lado luminoso disminuyeron la ingesta de comida grasa. Corroborando nuestros hallazgos, diversas investigaciones han demostrado que la comida es capaz de ejercer preferencia de lugar

similar a las drogas, ⁴² sin embargo, en estos experimentos la exposición del alimento apetecible es justo en el momento en que se realiza la prueba conductual.⁹³ Adicional a estos estudios, Johnson y Kenny (2010) demostraron cambio de preferencia de lugar de ratas expuestas a comida de cafetería. Estos trabajos indican que a pesar de las diferencias en el tiempo de exposición a la comida grasa, la especie animal empleada, la fórmula del alimento y del ambiente negativo asociado a la comida grasa, la dieta hipercalórica es un poderoso estimulante de conducta de preferencia adictiva en diversas especies de animales.

Una de las hipótesis más sobresalientes para explicar la conducta de adicción a estímulos gratificantes establece que el decremento del receptor de dopamina D2 correlaciona con el desarrollo de adicción a diversas drogas e inclusive se encuentra relacionado con la obesidad. En específico, estudios de imagenología cerebral en humanos adictos han demostrado decremento del D2 en el NAc⁸⁰. Este resultado también se reproduce en roedores.¹⁰³ Se cree que en estas condiciones de ausencia, el DRD2 regula la percepción de una recompensa y la coloca con un valor más alta cuando se compara con otras recompensas que rodean individuo. Lo anterior es respaldado por algunos estudios que demuestran que la disminución del DRD2, específicamente en el estriado ventral, es importante para promover la conducta impulsiva hacia la recompensa^{59,41}, o bien induciendo el bloqueo de la expresión de dicho receptor y promoviendo que los animales desarrollen incremento en la adicción.^{101,102} Como ejemplo de este tipo de conducta, están en personas con susceptibilidad a adicción que son portadoras del alelo Taq1 DRD2 A1, y que presentan decremento del D2 en el estriado.¹⁰⁴ De forma importante, se ha encontrado relacionado dicho alelo con la obesidad en mujeres.⁴³ Se cree que estas personas tienen alta sensibilidad a padecer algún tipo de adicción hacia estímulos adictivos.

En nuestro trabajo determinamos si los ratones que presentan conducta adictiva a la comida grasa mostraban decremento en la expresión de los receptores D2 en el NAc Shell. Los resultados indicaron que no existen cambios en los niveles de ARNm del receptor de dopamina D2 de ratones adictos cuando se compara con ratones no adictos. Nuestros resultados no correlacionan con lo demostrado en los estudios descritos, sin embargo, existe amplia evidencia que apoya el papel del decremento del receptor de dopamina D2 en el

desarrollo de la conducta adictiva, también existen reportes que demuestran ausencia de cambios en la expresión de este receptor en diversos escenarios de adicción.

Empleando ratones de la cepa C57BL/6, Vucetic et al. (2012)¹⁰⁵ demostró que la generación de obesidad inducida por dieta alta en grasa, conteniendo la misma fórmula que nosotros empleamos en nuestro estudio, no genera cambios en los niveles del D2 en el NAc. Adicionalmente, estudios en humanos obesos no han sido exitosos en detectar la disminución del DRD2 en el estriado y su relación con el índice de masa corporal u obesidad.^{39,106} Estos estudios correlacionan con lo obtenido en nuestro trabajo.

Finalmente, cabe señalar que el presente estudio demuestra por primera vez que el consumo de comida grasa promueve cambios en la preferencia de lugar hacia un escenario negativo que está asociado a la recompensa, sin afectar los niveles del receptor D2 en el NAc Shell. Son necesarios más experimentos para determinar el papel de otros sistemas de neurotransmisión, incluyendo al opioide o glutamatérgico vinculados a la regulación de las recompensas en los seres vivos.

CAPITULO VIII. CONCLUSIONES

El 47% de los animales expuestos a comida hipercalórica mostró preferencia adictiva a su consumo evidenciado por la prueba de preferencia de lugar. La conducta de preferencia no correlaciona con un cambio en la expresión del receptor D2 de dopamina en el núcleo accumbens. Son necesarios más experimentos para determinar si la conducta adictiva a la comida grasa involucra otros sistemas de neurotransmisión adicionales al sistema dopaminérgico.

CAPÍTULO IX.-BIBLIOGRAFÍA

- (1) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs331/es/>
- (2) Malik, V.S., Willett, W.C., y Hu F.B. (2013). Global obesity: trends, risk factors and policy implications. *Nat Rev Endocrinol*, 9(1):13-27.
- (3) Pérez Rodrigo, C. (2013). Current mapping of obesity. *Nutr Hosp*. 28 Suppl 5:21-31.
- (4) <http://news.bbc.co.uk/2/hi/health/7151813.stm>
- (5) Rtveladze, K., Marsh, T., Barquera, S., Sanchez Romero L.M., Levy, D., Melendez, G., Webber, L.,...Brown, M. (2014). Obesity prevalence in Mexico: impact on health and economic burden. *Public Health Nutr*, 17(1):233-9.
- (6) http://promocion.salud.gob.mx/dgps/descargas1/estrategia/Estrategia_con_portada.pdf
- (7) <http://www.foroconsultivo.org.mx/home/index.php/comunicacion-social/cti-al-instante/2312-diabetes-un-problema-de-peso->
- (8) Barquera, S., Campos, I., y Rivera, JA. (2013). Mexico attempts to tackle obesity: the process, results, push backs and future challenges. *Obes Rev*, 14 Suppl 2:69-78.
- (9) Hebebrand, J., Albayrak, Ö., Adan, R., Antel, J., Dieguez, C., de Jong, J., Leng, G.,...Dickson, S.L. (2014). "Eating addiction", rather than "food addiction", better captures addictive-like eating behavior. *Neurosci Biobehav Rev*, 47:295-306.
- (10) Nestler, E.J. (2013). Cellular basis of memory for addiction. *Dialogues Clin Neurosci*, 15(4): 431–443.
- (11) Walter Sinnott-Armstrong y Hannah Pickard. (2013). "What is Addiction?." *The Oxford Handbook of Philosophy and Psychiatry*. Ed. William Fulford.
- (12) Agrawal, A., Verweij, K.J., Gillespie, N.A., Heath, A.C., Lessov-Schlaggar, C.N., Martin, N.G., Nelson, E.C.,...Lynskey, M.T. (2012). The genetics of addiction—a translational perspective. *Transl Psychiatry*, 2:e140.
- (13) Fortuna, J.L. (2012). The Obesity Epidemic and Food Addiction: Clinical Similarities to Drug Dependence. *J Psychoactive Drugs*, 44(1):56-63.
- (14) Jauch-Chara, K., y Oltmanns, K.M. (2014). Obesity--a neuropsychological disease? Systematic review and neuropsychological model. *Prog Neurobiol*, 114:84-101.
- (15) Panagopoulos, V.N., y Ralevski, E. (2014). The role of ghrelin in addiction: a review. *Psychopharmacology (Berl)*, 231(14):2725-40.

- (16) Schreiber, L.R., Odlaug, B.L., y Grant J.E. (2013). The overlap between binge eating disorder and substance use disorders: Diagnosis and neurobiology. *J Behav Addict*, 2(4):191-8.
- (17) Sun, Y., Meng, S., Li, J., Shi, J., y Lu, L. (2013). Advances in genetic studies of substance abuse in China. *Shanghai Arch Psychiatry*, 25(4):199-211.
- (18) Noble, E.P. (2003). D2 Dopamine Receptor Gene in Psychiatric and Neurologic Disorders and Its Phenotypes. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 116B(1):103-25.
- (19) Haile, C.N., Kosten, T.R., y Kosten, T.A. (2007). Genetics of Dopamine and its Contribution to Cocaine Addiction. *Behav Genet*, 37(1):119-45.
- (20) Kelly D. Brownell, y Mark S. Gold. (2012). Food and Addiction: A Comprehensive Handbook. Part 1 THE NEUROBIOLOGY AND PSYCHOLOGY OF ADDICTION. 4 Genetics of addiction, pag. 30-33. ERNEST P. NOBLE. Oxford University Press, USA.
- (21) Kelly D. Brownell, y Mark S. Gold. (2012). Food and Addiction: A Comprehensive Handbook. Part 1 THE NEUROBIOLOGY AND PSYCHOLOGY OF ADDICTION. 2 Human Laboratory Models of Addiction, pag. 14-19. Barbara J. Mason and Amanda E. Higley. Oxford University Press, USA.
- (22) Vassoler, F.M., Byrnes, E.M., y Pierce, R.C. (2014). The Impact of Exposure to Addictive Drugs on Future Generations: Physiological and Behavioral Effects. *Neuropharmacology*, 76 Pt B:269-75.
- (23) Vassoler, F.M., White, S.L., Schmidt, H.D., Sadri-Vakili, G., y Pierce, R.C. (2013). Epigenetic Inheritance of a Cocaine Resistance Phenotype. *Nat Neurosci*, 16(1):42-7.
- (24) <http://news.sciencemag.org/biology/2014/07/moms-environment-during-pregnancy-can-affect-her-grandchildren>
- (25) Nestler, E.J. (2014). Epigenetic Mechanisms of Drug Addiction. *Neuropharmacology*, 76 Pt B:259-68.
- (26) Renthal, W., y Nestler, E.J. (2008). Epigenetic mechanisms in drug addiction. *Trends Mol Med*, 14(8):341-50.
- (27) Kelly D. Brownell, y Mark S. Gold. (2012). Food and Addiction: A Comprehensive Handbook. Part 1 THE NEUROBIOLOGY AND PSYCHOLOGY OF ADDICTION. 5

Epigenetics Changes in Addiction and Eating Disorders, pag. 34-39. Firas H. Kobeissy, Mahdi Razafsha, Zhiqun Zhang, y Mark S. Gold. Oxford University Press, USA.

(28) Bilinski, P., Wojtyla, A., Kapka-Skrzypczak, L., Chwedorowicz, R., Cyranka, M., y Studzinski, T. (2012). Epigenetic regulation in drug addiction. *Ann Agric Environ Med*, 19(3):491-6.

(29) Feng, J., y Nestler, E.J. (2013). Epigenetic Mechanisms of Drug Addiction. *Curr Opin Neurobiol*, 23(4):521-8.

(30) Nestler, E.J. Review. Transcriptional mechanisms of addiction: role of DeltaFosB. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 363(1507):3245-55.

(31) Robison, A.J., y Nestler, E.J. (2011). Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nat Rev Neurosci*, 12(11):623-37.

(32) Wang, L., Lv, Z., Hu, Z., Sheng, J., Hui, B., Sun, J., y Ma, L. (2010). Chronic Cocaine-Induced H3 Acetylation and Transcriptional Activation of CaMKII α in the Nucleus Accumbens Is Critical for Motivation for Drug Reinforcement. *Neuropsychopharmacology*, 35(4):913-28.

(33) Kandel, D.B., y Kandel, E.R. (2014). A Molecular Basis for Nicotine as a Gateway Drug. *N Engl J Med*, 371(21):2038-9.

(34) Levine, A., Huang, Y., Drisaldi, B., Griffin, E.A. Jr., Pollak, D.D., Xu, S., Yin, D.,...Kandel, E.R. (2011). Molecular Mechanism for a Gateway Drug: Epigenetic Changes Initiated by Nicotine Prime Gene Expression by Cocaine. *Sci Transl Med*, 3(107):107ra109.

(35) Vassoler, F.M., Byrnes, E.M., y Pierce, R.C. (2014). The Impact of Exposure to Addictive Drugs on Future Generations: Physiological and Behavioral Effects. *Neuropharmacology*, 76 Pt B:269-75.

(36) Fortuna, J.L. (2012). The Obesity Epidemic and Food Addiction: Clinical Similarities to Drug Dependence. *J Psychoactive Drugs*, 44(1):56-63.

(37) Jauch-Chara, K., y Oltmanns, K.M. (2014). Obesity--a neuropsychological disease? Systematic review and neuropsychological model. *Prog Neurobiol*, 114:84-101.

(38) Panagopoulos, V.N., y Ralevski, E. (2014). The role of ghrelin in addiction: a review. *Psychopharmacology (Berl)*, 231(14):2725-40.

- (39) Schreiber, L.R., Odlaug, B.L., y Grant J.E. (2013). The overlap between binge eating disorder and substance use disorders: Diagnosis and neurobiology. *J Behav Addict*, 2(4):191-8.
- (40) Tomasi, D., y Volkow, N.D. (2013). Striatocortical pathway dysfunction in addiction and obesity: differences and similarities. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 48(1):1-19.
- (41) Berridge, K.C., y Kringelbach, M.L. (2015). Pleasure Systems in the Brain. *Neuron*, 86(3):646-64.
- (42) Johnson, P.M., y Kenny, P.J. (2010). Addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats: Role for dopamine D2 receptors. *Nat Neurosci*, 13(5):635-41.
- (43) Noble, E.P., Noble, R.E., Ritchie, T., Syndulko, K., Bohlman, M.C., Noble, L.A., Zhang, Y.,...Grandy, D.K. (1994). D2 Dopamine Receptor Gene and Obesity. *Int J Eat Disord*, 15(3):205-17.
- (44) Blaszczynski, A., y Nower, L. (2002). A pathways model of problem and pathological gambling. *Addiction*, 97(5):487-99.
- (45) Shriner, R., y Gold, M. (2014). Food Addiction: An Evolving Nonlinear Science. *Nutrients*, 6(11):5370-91.
- (46) Nestler, E.J. (2005). Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat Neurosci*, 8(11):1445-9.
- (47) Jordi, E., Heiman, M., Marion-Poll, L., Guernonprez, P., Cheng, S.K., Nairn, A.C., Greengard, P., y Girault J.A. (2013). Differential effects of cocaine on histone posttranslational modifications in identified populations of striatal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(23):9511-6.
- (48) OLDS, J., y MILNER, P. (1954). Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol*, 47(6):419-27.
- (49) Haber, S.N., Knutson, B. (2010). The Reward Circuit: Linking Primate Anatomy and Human Imaging. *Neuropsychopharmacology*, 35(1):4-26.

- (50) Lévêque, M. (2014). Psychosurgery: New Techniques for Brain Disorders. Chapter 2. The Neuroanatomy of Emotions, pag. 49-106. Springer International Publishing Switzerland.
- (51) Albanese, A., Altavista, M.C., y Rossi, P. (1986). Organization of central nervous system dopaminergic pathways. *J Neural Transm Suppl*, 22:3-17.
- (52) Baik, J.H. (2013). Dopamine signaling in food addiction: role of dopamine D2 receptors. *BMB Rep*, 46(11):519-26.
- (53) Tabrez, S., Jabir, N.R., Shakil, S., Greig, N.H., Alam, Q., Abuzenadah, A.M., Damanhour, G.A., y Kamal, M.A. (2012). A Synopsis on the Role of Tyrosine Hydroxylase in Parkinson's Disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 11(4):395-409.
- (54) Scott Brady, George Siegel, R. Wayne Albers, y Donald Price. (2005) Basic Neurochemistry. MOLECULAR, CELLULAR AND MEDICAL ASPECTS. Chapter 12 Catecholamines. Michael J. Kuhar, Kenneth Minneman, y E. Christopher Muly. Seventh Edition. Academic Press, USA.
- (55) Beaulieu, J.M., Gainetdinov, R.R. (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev*, 63(1):182-217.
- (56) Kim Neve. (2009). The Dopamine Receptors. Chapter 2 Gene and Promoter Structures of the Dopamine Receptors. pag. 23-46. Ursula M. D'Souza. 2nd Edition. Humana Press, a part of Springer Science+Business Media, USA.
- (57) Vallone, D., Picetti, R., Borrelli, E. (2000). Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev*, 24(1):125-32.
- (58) Yung, K.K., Smith, A.D., Levey, A.I., y Bolam, J.P. (1996). Synaptic Connections Between Spiny Neurons of the Direct and Indirect Pathways in the Neostriatum of the Rat: Evidence from Dopamine Receptor and Neuropeptide Immunostaining. *Eur J Neurosci*, 8(5):861-9.
- (59) Calabresi, P., Picconi, B., Tozzi, A., Ghiglieri, V., Di Filippo, M. (2014). Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nat Neurosci*, 17(8):1022-30.
- (60) Bonelli, R.M., y Cummings, J.L. (2007). Frontal-subcortical circuitry and behavior. *Dialogues Clin Neurosci*, 9(2):141-51.

- (61) Alcaro, A., Huber, R., y Panksepp, J. (2007). Behavioral Functions of the Mesolimbic Dopaminergic System: an Affective Neuroethological Perspective. *Brain Res Rev*, 56(2):283-321.
- (62) Krack, P., Hariz, M.I., Baunez, C., Guridi, J., y Obeso, J.A. (2010). Deep brain stimulation: from neurology to psychiatry? *Trends Neurosci*, 33(10):474-84.
- (63) Leisman, G., Braun-Benjamin, O., y Melillo, R. (2014). Cognitive-motor interactions of the basal ganglia in development. *Front Syst Neurosci*, 8:16.
- (64) Maia, T.V., Cooney, R.E., y Peterson, B.S. (2008). The Neural Bases of Obsessive-Compulsive Disorder in Children and Adults. *Dev Psychopathol*, 20(4):1251-83.
- (65) Obeso, J.A., Rodríguez-Oroz, M.C., Benitez-Temino, B., Blesa, F.J., Guridi, J., Marin, C., y Rodriguez, M. (2008). Functional Organization of the Basal Ganglia: Therapeutic Implications for Parkinson's Disease. *Mov Disord*, 23 Suppl 3:S548-59.
- (66) Alexander, G.E., DeLong, M.R., y Strick, P.L. (1986). PARALLEL ORGANIZATION OF FUNCTIONALLY SEGREGATED CIRCUITS LINKING BASAL GANGLIA AND CORTEX. *Annu Rev Neurosci*, 9:357-81.
- (67) Redgrave, P., Rodriguez, M., Smith, Y., Rodriguez-Oroz, M.C., Lehericy, S., Bergman, H., Agid, Y.,... Obeso, J.A. (2010). Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: implications for Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci*, 11(11):760-72.
- (68) Groman, S.M., y Jentsch, J.D. (2012). COGNITIVE CONTROL AND THE DOPAMINE D2-LIKE RECEPTOR: A DIMENSIONAL UNDERSTANDING OF ADDICTION. *Depress Anxiety*, 29(4):295-306.
- (69) Dani, J.A., Ji, D., y Zhou, F.M. (2001). Synaptic Plasticity and Nicotine Addiction. *Neuron*, 31(3):349-52.
- (70) Hanlon, C.A., Beveridge, T.J., y Porrino, L.J. (2013). Recovering from Cocaine: Insights from Clinical and Preclinical Investigations. *Neurosci Biobehav Rev*, 37(9 Pt A):2037-46.
- (71) Rao, P.S., Bell, R.L., Engleman, E.A., y Sari, Y. (2015). Targeting glutamate uptake to treat alcohol use disorders. *Front Neurosci*, 9:144.
- (72) Liang, J., y Olsen, R.W. (2014). Alcohol use disorders and current pharmacological therapies: the role of GABAA receptors. *Acta Pharmacol Sin*, 35(8):981-93.

- (73) Groenewegen, H.J. (2003). The Basal Ganglia and Motor Control. *Neural Plast*, 10(1-2):107-20.
- (74) Gottfried, J.A. (2011). Neurobiology of Sensation and Reward. Chapter 11 Neuroanatomy of Reward: A View from the Ventral Striatum, pag. 235-254. Haber, S.N. CRC Press, Boca Raton (FL).
- (75) Devan, B.D., Hong, N.S., McDonald, R.J. (2011). Parallel associative processing in the dorsal striatum: Segregation of stimulus–response and cognitive control subregions. *Neurobiol Learn Mem*, 96(2):95-120.
- (76) Kreitzer, A.C., Malenka, R.C. (2008). Striatal Plasticity and Basal Ganglia Circuit Function. *Neuron*, 60(4):543-54.
- (77) Kelly D. Brownell, y Mark S. Gold. (2012). Food and Addiction: A Comprehensive Handbook. Part 1 THE NEUROBIOLOGY AND PSYCHOLOGY OF ADDICTION. 3 Neuroanatomy of addiction, pag. 20-29. George F. Koob. Oxford University Press, USA.
- (78) Eric Kandel, James Schwartz, Thomas Jessell, Steven Siegelbaum, y A. J. Hudspeth. (2012). Principles of Neural Science. Part VII: The Unconscious and Conscious Processing of Neural Information. Chapter 49 Homeostasis, Motivation, and Addictive States, pag 1095-1115 . Fifth Edition. McGraw Hill Professional.
- (79) Salgado, S., y Kaplitt, MG. (2015). The Nucleus Accumbens: A Comprehensive Review. *Stereotact Funct Neurosurg*, 93(2):75-93.
- (80) Volkow, N.D., Fowler, J.S., Wang, G.J., y Swanson, J.M. (2004). Dopamine in drug abuse and addiction: results from imaging studies and treatment implications. *Mol Psychiatry*, 9(6):557-69.
- (81) Everitt, B.J., y Robbins, T.W. (2005). Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci.*, 8(11):1481-9.
- (82) Koob, G.F., y Volkow, N.D. (2010). Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*. 35(1):217-38.
- (83) de Jong, J.W., Roelofs, T.J., Mol, F.M., Hillen, A.E., Meijboom, K.E., Luijendijk, M.C., van der Eerden, H.A.,...Adan, R.A. (2015). Reducing Ventral Tegmental Dopamine D2 Receptor Expression Selectively Boosts Incentive Motivation. *Neuropsychopharmacology*. 40(9):2085-95.

- (84) Guo, J., Simmons, W.K., Herscovitch, P., Martin, A., y Hall, K.D. (2014). Striatal dopamine D2-like receptor correlation patterns with human obesity and opportunistic eating behavior. *Mol Psychiatry*.19(10):1078-84.
- (85) Boundy, V.A., Gold, S.J., Messer, C.J., Chen, J., Son, J.H., Joh, T.H., y Nestler, E.J. (1998). Regulation of tyrosine hydroxylase promoter activity by chronic morphine in TH9.0-LacZ transgenic mice. *J Neurosci*.18(23):9989-95.
- (86) Ye, M., Lee, H., Bae, H., Hahm, D.H., Lee, H.J., y Shim, I. (2015). Paecilomyces japonica reduces repeated nicotine-induced neuronal and behavioral activation in rats. *BMC Complement Altern Med*.15:227.
- (87) Vrana, S.L., Vrana, K.E., Koves, T.R., Smith, J.E., y Dworkin, S.I. (1993). Chronic cocaine administration increases CNS tyrosine hydroxylase enzyme activity and mRNA levels and tryptophan hydroxylase enzyme activity levels. *J Neurochem*. 61(6):2262-8
- (88) J. Cragg, y Margaret, E. Rice. (2005). Somatodendritic Dopamine Release in Midbrain. *Dendritic Neurotransmitter Release*. 69-83.
- (89) Rice, M.E., y Patel, J.C. (2015). Somatodendritic dopamine release: recent mechanistic insights. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 370(1672).
- (90) Kelly D. Brownell, y Mark S. Gold. (2012). Food and Addiction: A Comprehensive Handbook. Part 1 THE NEUROBIOLOGY AND PSYCHOLOGY OF ADDICTION. 1 Animal Models of Drug Addiction, pag. 3-13. GEORGE F. KOOB. Oxford University Press, USA.
- (91) Richardson, N.R., y Roberts, D.C. (1996). Progressive ratio schedules in drug self-administration studies in rats: a method to evaluate reinforcing efficacy. *J Neurosci Methods*, 66(1):1-11.
- (92) Bourin, M., y Hascoët, M. (2003). The mouse light/dark box test. *Eur J Pharmacol*, 463(1-3):55-65.
- (93) Perello, M., Sakata, I., Birnbaum, S., Chuang, J.C., Osborne-Lawrence, S., Rovinsky, S.A., Woloszyn, J.,...Zigman, J.M. (2010). Ghrelin Increases the Rewarding Value of High-Fat Diet in an Orexin-Dependent Manner. *Biol Psychiatry*, 1;67(9):880-6.

- (94) Mueller, D., y Stewart, J. (2000). Cocaine-induced conditioned place preference: reinstatement by priming injections of cocaine after extinction. *Behav Brain Res.*115(1):39-47.
- (95) Grahame, N.J., Chester, J.A., Rodd-Henricks, K., Li T.K., y Lumeng, L. (2001). Alcohol place preference conditioning in high- and low-alcohol preferring selected lines of mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 68(4):805-14.
- (96) Cunningham, C.L., Gremel, C.M., y Groblewski, P.A. (2006). Drug-induced conditioned place preference and aversion in mice. *Nat Protoc.*1(4):1662-70.
- (97) Le Foll, B., y Goldberg, S.R. (2005). Nicotine induces conditioned place preferences over a large range of doses in rats. *Psychopharmacology (Berl).*178(4):481-92.
- (98) Velázquez-Sánchez, C., Santos, J.W., Smith, K.L., Ferragud, A., Sabino, V., y Cottone, P. (2015). Seeking behavior, place conditioning, and resistance to conditioned suppression of feeding in rats intermittently exposed to palatable food. *Behav Neurosci.*129(2):219-24.
- (99) Camacho, A., Rodriguez-Cuenca, S., Blount, M., Prieur, X., Barbarroja, N., Fuller, M., Hardingham, G.E., y Vidal-Puig, A. (2012). Ablation of PGC1 beta prevents mTOR dependent endoplasmic reticulum stress response. *Exp Neurol.* 237(2):396-406.
- (100) Berridge, K.C., y Robinson, T.E. (1998). What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res Brain Res Rev.* 28(3):309-69.
- (101) Johnson, P.M., y Kenny, P.J. (2010). Dopamine D2 receptors in addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats. *Nat Neurosci.*13(5):635-41.
- (102) Bello, E.P., Mateo, Y., Gelman, D.M., Noaín, D., Shin, J.H., Low, M.J., Alvarez, V.A.,...Rubinstein, M. (2011). Cocaine supersensitivity and enhanced motivation for reward in mice lacking dopamine D2 autoreceptors. *Nat Neurosci.*14(8):1033-8.
- (103) Dalley, J.W., Fryer, T.D., Brichard, L., Robinson, E.S., Theobald, D.E., Lääne, K., Peña, Y.,...Robbins TW. (2007). Nucleus accumbens D2/3 receptors predict trait impulsivity and cocaine reinforcement. *Science.* 315(5816):1267-70.
- (104) Corominas, M., Roncero, C., Bruguera, E., y Casas, M. (2007). Sistema dopaminérgico y adicciones. [REV NEUROL 2007;44:23-31].

- (105) Vucetic, Z., Carlin, J.L., Totoki, K., y Reyes, T.M. (2012). Epigenetic dysregulation of the dopamine system in diet-induced obesity. *J Neurochem*, 120(6):891-8.
- (106) Karlsson, H.K., Tuominen, L., Tuulari, J.J., Hirvonen, J., Parkkola, R., Helin, S., Salminen, P.,...Nummenmaa, L. (2015). Obesity is associated with decreased μ -opioid but unaltered dopamine D2 receptor availability in the brain. *J Neurosci*. 35(9):3959-65.